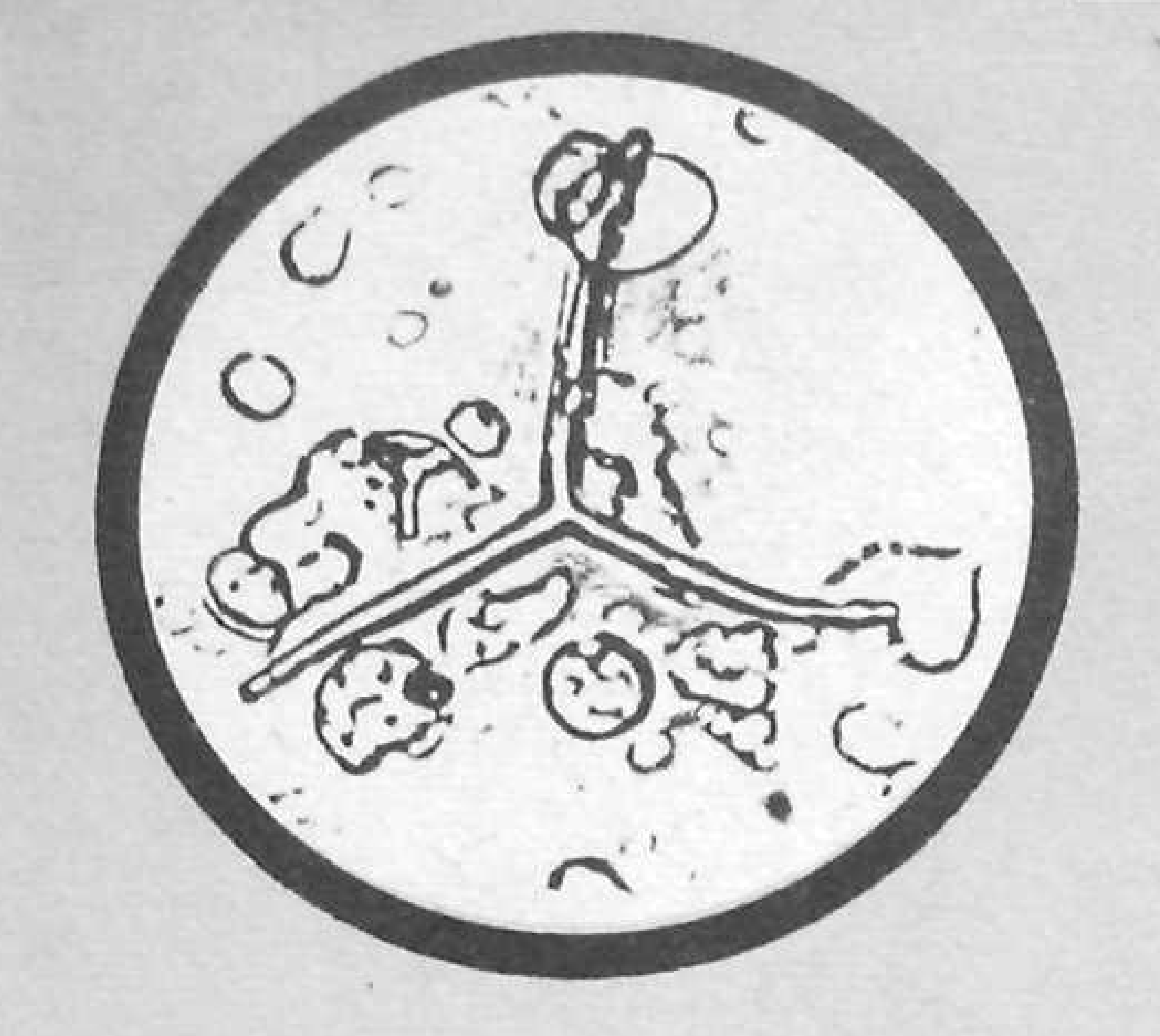


В.В. ИСАЕВА



КЛЕТКИ В МОРФОГЕНЕЗЕ

«НАУКА»

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ДАЛЬНЕВОСТОЧНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
Институт биологии моря

В.В. ИСАЕВА

КЛЕТКИ В МОРФОГЕНЕЗЕ



УДК 591.3

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
(код проекта 93-04-21635)

Исаева В.В. Клетки в морфогенезе. – М.: Наука, 1994. – 224 с.
ISBN 5-02-005760-6

Рассматриваются клеточные основы пространственно-временной организации морфогенеза – вклад морфогенетических клеточных реакций в создание надклеточных структур. Представлены литературные данные о роли контактных реакций клетка–клетка и клетка–субстрат. Приведены сведения о морфогенетической функции цитоскелета на клеточном и надклеточном уровнях, обосновано представление о роли цитоскелета яйцевых клеток как глобального детерминанта осевой анизотропии яйца и проморфологии будущего организма.

Для эмбриологов, цитологов, специалистов по разведению морских беспозвоночных.

Ил. 128. Библ. 95 с.

Ответственный редактор

д-р биол. наук *Л.В. Белоусов*

Рецензенты:

д-р биол. наук *Г.А. Бузников*,
д-р биол. наук *Ю.С. Хотимченко*

И $\frac{1910000000-430}{042(02)-94}$ 346–94, I полугодие

ISBN 5-02-005760-6

ПРЕДИСЛОВИЕ

Изучение морфогенеза на клеточном и надклеточном уровнях, связи локальных и интегральных событий в морфогенезе, создания пространственной организации, как и смены пространственных паттернов во времени, – вечные проблемы биологии. Ясно, что реакции клетки как основного морфофункционального элемента организма многоклеточных животных и растений лежат в основе морфогенеза на клеточном и надклеточном уровнях. Исследованиям цитологических основ морфогенеза существенный импульс был дан работами Густафсона и Уолперта (Gustafson, Wolpert, 1963), Тринкауса (Trinkaus, 1984), Дьюкар (Deuchar, 1975). Для понимания морфогенетических клеточных реакций важен как экспериментальный подход – эксплантации клеток из организма в упрощенные и контролируемые условия in vitro, так и сравнительный взгляд – изучение клеток разного типа, различных уровней дифференциации и разных организмов.

Слишком широкое название этой монографии, словно претендующее на охват необъятных проблем биологии развития и биологии клетки, выбрано главным образом в попытке объединить собственные экспериментальные данные (полученные на таких различных клетках и клеточных системах, как яйцеклетки иглокожих и бурой водоросли, культуры спикулогенных клеток эмбрионов морского ежа и миогенных клеток куриных эмбрионов, целомоциты иглокожих) и встроить эти данные в единое поле исследований морфогенеза. Поэтому при стремлении к связности материала неизбежна, неустранима и фрагментарность изложения, существенные пробелы, если не провалы, мостиками через которые оказываются иногда лишь ссылки на литературные данные. С другой стороны, именно эти "провалы" нередко представляют собой относительно хорошо исследованные области, заполненные массой литературы, обзорами и монографиями, вторичный или третичный пересказ которых вряд ли необходим. В обширном поле исследований морфогенеза на клеточном и надклеточных уровнях немало и реальных пробелов, малоизученных участков – некоторые из них рассмотрены более внимательно.

В данной работе задачи экспериментального исследования были ограничены изучением клеточных механизмов морфогенеза, главным образом вклада контактных реакций клетка–клетка и клетка–субстрат в морфогенез при переходе от клеточного к надклеточному уровню организации. Исследовалось влияние на морфогенез по возможности

самых простых факторов, в частности физических – наличия или отсутствия твердого субстрата для прикрепления клеток, дающего механическую опору для прикрепления, физических ориентиров субстрата, создающих граничные условия для передвижения культивируемых клеток. Изучены процессы самоорганизации клеток, структурирования в простых модельных системах однослойных и суспензионных клеточных культур, допускающих иногда реализацию потенциальных возможностей клеточных систем, не осуществляемых в организме.

Объектами экспериментального исследования выбраны одноклеточные или относительно простые надклеточные системы, характеризующиеся ясно выраженной связью – *пространственной* и (или) *временной* – клеточного и надклеточного уровней, что позволяет оценить вклад событий на клеточном уровне в создание надклеточной организации. Почти все *использованные* экспериментальные объекты представляют собой развивающиеся, дифференцирующиеся системы, что дает возможность проследить преемственность пространственных паттернов в ходе *развития*, при переходе от клеточного к надклеточному уровню организации.

Поскольку передача информации от внешней среды и ответ клетки опосредованы цитоскелетом, опорно-двигательной системой клетки, и именно цитоскелет–цитомускулатура оказывается движущей силой морфогенеза на клеточном и надклеточном уровнях, по возможности исследована и проанализирована роль цитоскелета в морфогенетических клеточных реакциях. Показана *морфогенетическая роль локальных* контактных реакций клетки (без исследования молекулярных механизмов этих клеточных реакций) в создании пространственных и пространст*венно-временных клеточных и надклеточных структурных паттернов*. На основании этих экспериментальных результатов и анализа данных литературы сформулированы теоретические положения о функционировании цитоскелета яйца в качестве глобального морфогенетического детерминанта, об интегральной реакции поляризации клетки как первичного морфогенетического акта на клеточном уровне, о плоскостной и линейной контактной ориентации клеток, о роли физических граничных условий как источника позиционной информации, организующей пространственные паттерны клеточных систем in vitro, и об эпигенетической памяти клеток и надклеточных систем.

Я очень признательна Л.В. Белоусову, Г.А. Бузникову и А.Д. Бершадскому за ценные критические замечания. Неизменно благодарна прежде всего Е.В. Преснову и А.Ю. Керкису; частично наши совместные данные, приведенные здесь, еще не опубликованы. Для меня неоценима постоянная поддержка и помощь В.Л. Касьянова.

Глава I
ПРОМОРФОЛОГИЯ ЯЙЦЕВЫХ КЛЕТОК И МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ФУНКЦИЯ ЦИТОСКЕЛЕТА

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ЯЙЦЕКЛЕТКИ: РОЛЬ ЦИТОСКЕЛЕТА

Цитоархитектоника яйца – одноклеточного канала связи между поколениями (Равен, 1964) – не только проявление высокоспецифичной дифференцировки, но и отражение проморфологии будущего организма, поскольку анизотропия морфофункциональной организации яйцевой *клетки определяет* в основных чертах план построения зародыша, а затем и взрослого организма. Исследование структур и белков цитоскелета яиц выявляет его особую, "судьбоносную" роль и дает ключ к объяс*нению глобальной анизотропии яйца*.

Данные экспериментальной эмбриологии, обобщенные в классических книгах Вильсона (Wilson, 1925), Моргана (Morgan, 1927), Дэвидсона (Davidson, 1986) и недавнем обзоре Джеффри (Jeffery, 1988), свидетельствуют о локализации в цитоплазме яйцеклетки морфогенетических детерминантов – факторов, определяющих общую проморфологию будущего зародыша и судьбу отдельных бластомеров или их групп. Из концепций Вильсона и Моргана вытекает и принятое к настоящему времени объяснение детерминации судьбы бластомеров контролирующими экспрессию генома (а у некоторых групп животных – редукцию части генома в бластомерах соматической линии) локальными различиями ооплазмы.

Основным носителем проморфологии, пространственной информации о будущем развитии служит кортикальный слой (кортекс) яйца. Динамические свойства кортекса яйцеклетки, ответственные за проявление пространственной организации яйца и раннего эмбриона, определяются морфофункциональным строением кортикального матрикса (цитоскеле*та), ассоциированного с оолеммой и включающего мембранные органои*ды и макромолекулярные комплексы (обзоры: Vacquier, 1981; Jeffery, 1984; Schatten, 1984; Schroeder, 1986; Sardet, Chang, 1987).

Ооплазматическая локализация морфогенетических детерминантов создается в ходе оогенеза под контролем материнского генома и окончательно устанавливается, как правило, к началу дробления. Становлению типичного "рисунка" распределения компонентов ооплазмы у многих животных предшествует ооплазматическая сегрегация: обширные и интенсивные перемещения кортикальной ооплазмы, реже и эндоплазмы яйца, вызываемые проникновением спермия или искусственной активацией; у некоторых животных найдены морфогенетические значимые перемещения компонентов ооплазмы также в ходе раннего дробления. Контроль функционирования генома ооплазматическим окружением ясно продемонстрирован экспериментами с трансплантацией ооплазмы (или ее компонентов) и ядер. Независимость реализации программы

раннего развития, созданной в ходе оогенеза, от транскрипции генома зародыша, т.е. разрыв во времени между транскрипцией и конечной экспрессией генов, наиболее отчетливо проявляется в материнском эффекте (см.: Davidson, 1986; Gilbert, 1988).

Как известно, белковый синтез раннего зародыша обеспечивается "материнскими" информационными РНК, запасаемыми в ходе оогенеза. Информационная РНК, количественно и качественно неравномерно распределенная в ооплазме, – наиболее вероятный кандидат на роль морфогенетических детерминантов (обзоры: Raff, Showman, 1985; Davidson, 1986; Jeffery et al., 1986; Jeffery, 1988; Исаева, 1990а). Так, в яйцах асцидий найдено неоднородное пространственное распределение полиаденилированной РНК и индивидуальных мРНК актина и гистонов; в ходе ооплазматической сегрегации РНК упорядоченным образом перераспределяется вместе с разными областями ооплазмы, и почти половина всей мРНК актина к началу дробления оказывается сконцентрированной в зоне желтого серпа, дающего в дальнейшем мезенхимные и мышечные клетки личинки (Jeffery, 1983, 1985; Jeffery et al., 1984, 1986), в вегетативном полушарии локализуется мРНК, белковый продукт трансляции которой необходим для гаструляции и последующего морфогенеза зародыша (Jeffery, 1990). Количественно и качественно неравномерное распределение в яйце поли(А)-РНК, мРНК актина, гистонов, рРНК, существенное для судьбы регионов яйца и зародыша, найдено у кольчатого червя Chaetopterus (Jeffery, 1985; Swalla et al., 1985).

В ооцитах и яйцах шпорцевой лягушки выявлены качественные и количественные различия распределения поли(А)-РНК (King, Barklis, 1985) и некоторых транслируемых в бесклеточной системе мРНК (Smith, 1986) по анимально-вегетативной оси; выявлена также преимущественная локализация мРНК актина и тубулина в кортикальном слое ооцитов (Perry, Capco, 1988) и связывание этих мРНК с цитоскелетом (Hauptman et al., 1989).

Проведенные исследования на насекомых свидетельствуют о том, что ооплазматические детерминанты клеток половой линии (Okada, Togashi, 1985) и детерминанты осевого паттерна (Kalthoff, Elbetieha, 1986) представлены специфическими наборами РНК. Так, например, в яйцах и ранних зародышах дрозофилы обнаружен переднезадний градиент распределения материнских транскриптов гена caudal (Mlodzik, Gehring, 1987) и гена bicoid (Driever, Nüsslein-Volhard, 1988; Johnson et al., 1989). Материнские транскрипты гена oscar, контролирующего развитие половых клеток и структур заднего полюса тела зародыша дрозофилы, локализуются в ходе оогенеза на заднем полюсе ооцита (Kim-Ha et al., 1991; Ruohala et al., 1991). Передне-задний градиент распределения в синцитиальной бластодерме зародыша выявлен для белковых продуктов трансляции транскриптов генов bicoid и caudal – детерминантов передне-заднего осевого паттерна зародышей; становится ясным и механизм действия белкового продукта гена bicoid, контролирующего транскрипцию одного из генов сегментации (Driever, Nüsslein-Volhard, 1989). Таким образом, паттерн распределения отдельных видов информационной РНК в ооплазме яйца и зародыша

постепенно сменяется соответствующим паттерном распределения белковых продуктов их трансляции, что может происходить уже в ходе оогенеза (Jeffery, 1983, 1988; Uzman, Jeffery, 1986).

Анизотропия компонентов оолеммы с рецепторной, транспортной, энзиматической функциями тоже может детерминировать судьбу регионов зародыша при условии стабильности и наследуемости в ходе раннего дробления региональных различий плазматической мембраны яйца, т.е. ограничения свободной латеральной подвижности мембранных компонентов, что и было обнаружено на яйцах шпорцевой лягушки и моллюска Nassarius (Dictus et al., 1984; Speknsijder et al., 1984).

В кортикальных гранулах и других мембранных везикулах зрелого неоплодотворенного яйца морского ежа запасены различные компоненты внеклеточного матрикса, секретируемые как сразу после слияния гамет, так и в ходе дальнейшего развития и определяющие морфогенетически значимые взаимодействия и перемещения клеток зародыша (Wessel et al., 1984; Alliegro, McClay, 1988).

Упорядоченная и поляризованная по анимально-вегетативной оси организация яйца вовлекает распределение всех клеточных органоидов, однако сведения об анизотропном распределении в ооплазме органоидов и макромолекул, уточняя и детализируя общую картину высокоупорядоченной структуры ооплазмы, не вносят принципиально нового в понимание механизмов установления и поддержания этого порядка.

Исследование же структур и белков цитоскелета яиц не только выявляет его пространственную неоднородность, но и объясняет глобальную анизотропию яйца. Известно, что пространственная гетерогенность распределения всех субклеточных компонентов соматических клеток – это функция цитоскелета, цитоматрикса (см.: Schliwa, 1986; Porter, 1987). Анизотропия распределения в ооплазме РНК (РНП), митохондрий, пигментных и кортикальных гранул и других мембранных органоидов, как и компонентов плазматической мембраны, также, по-видимому, обусловлена их связыванием гелеподобной цитоскелетной сетью, прежде всего сетью актиновых филаментов, наиболее развитой в кортикальном слое яйцевых клеток. Это показали исследования, проведенные на яйцах морского ежа (Moon et al., 1983; Sardet, 1984), асцидий (Jeffery, Meier, 1983; Uzman, Jeffery, 1986; Jeffery, 1988), кольчатых червей (Shimizu, 1984, 1985, 1986; Jeffery, 1985), насекомых (Berry, 1985), амфибий (Gall et al., 1983; Wylie et al., 1985; Hauptman et al., 1989).

Кортекс яйцеклетки – плазматическая мембрана с прилегающим слоем цитоплазмы толщиной в несколько микронов – оказывает мощное морфогенетическое воздействие в процессе развития. Динамические свойства этого домена яйцеклетки, ответственные за проявление основных черт строения яйца и раннего эмбриона, определяются морфофункциональной организацией кортикального матрикса (цитоскелета), ассоциированного с оолеммой и включающего мембранные органоиды и макромолекулярные комплексы (обзоры: Vacquier, 1981; Jeffery, 1984; Sardet, Chang, 1987). Структурная организация кортекса яиц различных животных характеризуется мощным цитоскелетным каркасом, включаю-

щим пучки актиновых филаментов как основу микроворсинок поверхности (реже поверхность яйца образует складки или иные структуры) и плотное кортикальное сплетение актиновых филаментов.

Наиболее общая и устанавливаемая, как правило, до оплодотворения характеристика проморфологии яйца животных – его анимально-вегетативная полярность. Поляризация распределения актина и (или) актиновых филаментов с концентрацией у одного из полюсов обнаружена в зиготах бурой водоросли (Brawley, Robinson, 1985), в яйцах нематод (Hill, Strome, 1988), кольчатых червей (Shimizu, 1986; Fernandez et al., 1987), асцидий (Jeffery, Meier, 1983; Sawada, 1988; Uzman, Jeffery, 1986), млекопитающих (см.: Longo, 1985; Maro et al., 1986). Рассеянные во многих статьях и, в частности, в цитированных выше работах многочисленные сведения о различиях рельефа поверхности анимального и вегетативного полюсов яиц (наличие, отсутствие, относительная численность микроворсинок или каких-либо иных образований, их размеры, форма) также косвенно свидетельствуют о поляризации распределения компонентов цитоскелета, поскольку рельеф поверхности определяется особенностями кортикального цитоскелета.

Так, цитоскелетной основой микроворсинок поверхности яиц морского ежа служит ригидный структурный комплекс актин–фасцин и отсутствие микроворсинок на вегетативном полюсе раннего зародыша морского ежа указывает на локальные особенности кортикального цитоскелета (см.: Schroeder, 1986, 1988). Отличия организации цитоскелета вегетативного полюса яиц некоторых видов морских ежей и ооцитов морской звезды описаны также и в других работах (Dan, 1984; Sardet, 1984, Schroeder, 1985; Sardet, Chang, 1987). Подобным образом локальна концентрация актина и спектрина на анимальном полюсе яиц мыши (Reima, Lehtonen, 1985). Поляризация поверхности яиц, проявляющаяся в различиях рельефа и способности кортекса к сокращению, найдена у вьюна (Ivanenkov et al., 1990).

В цепи событий, индуцируемых контактным взаимодействием гамет, как и в других морфогенетических процессах, важным промежуточным механизмом контроля внутриклеточных процессов, и в частности агрегатного состояния актина и тубулина, служит временный подъем концентрации свободных ионов кальция в цитозоле и сдвиг pH (см.: Stanisstreet, Jumah, 1983; Epel, 1984; Busa, Nuccitelli, 1985). Вхождение спермия (или локализованная искусственная активация) вызывает прохождение по поверхности яйца волн разнообразной природы: активации, экзоцитоза кортикальных гранул, подъема концентрации ионов кальция, сокращения поверхности (Vacquier, 1981; Busa, Nuccitelli, 1985; Kline, Nuccitelli, 1985; Cheer et al., 1987). Эти волны распространяются либо от точки вхождения спермия, либо от анимального полюса и сопряжены с перестройками системы актиновых филаментов. В яйце морского ежа выявлена волна полимеризации актина, проходящая в кортексе от места вхождения спермия (Yonemura, Mabuchi, 1987). Исследования кольцевой зоны кортикального сокращения, волнообразно перемещающейся от анимального полюса к вегетативному при ооплазматической сегрегации у представителей ракообразных (Lewis, 1977) и кольчатых червей (Shimizu, 1982, 1984, 1986), свидетельствуют о перестройке сети актиновых филаментов в зоне сокращения.

Морфофункциональная организация системы актиновых филаментов интегрирована как в яйцевых, так и в соматических клетках с динамикой системы микротрубочек. Последняя представлена главным образом астерами и веретенами – мейотическими в созревающих ооцитах и митотическими в дробящихся яйцах. В развитии морского ежа, морской звезды, асцидий и, вероятно, большинства других животных функционирует центросома, вносимая спермием, тогда как материнская центросома не участвует в событиях оплодотворения и раннего дробления (Schatten et al., 1986a,b, 1988; Sawada, Schatten, 1988; Sluder et al., 1989). В развитии мыши, наоборот, функционирует унаследованная от ооцита центросома; после вхождения спермия в яйцо возникают многочисленные астеры материнского происхождения, которые затем ассоциируются с пронуклеусами и позже формируют два полюса митотического веретена (Schatten et al., 1985, 1986b; Maro et al., 1986). Многочисленные центриоли и астеры появляются в яйцах морского ежа при партеногенетической активации (Kallenbach, 1983, 1985), при повышенной температуре (Harris et al., 1989), а также обработке гексиленгликолем (Endo et al., 1990). В кортексе ооцитов морских звезд (Otto, Schroeder, 1984; Schroeder, 1986) найдены беспорядочно ориентированные микротрубочки, не связанные с каким-либо явным центром организации. Сходная цитоплазматическая сеть микротрубочек обнаружена также в яйцах мыши (Schatten et al., 1985) и асцидий (Sawada, Schatten, 1988).

Имеются свидетельства направляющей поляризацию функцию системы микротрубочек: мейотического веретена в ооците мыши (см.: Longo, 1985), спермастера оплодотворенных яиц шпорцевой лягушки (Ubbells et al., 1983; Gautier, Tencer, 1987; Houliston, Elinson, 1991) и асцидий (Sawada, Schatten, 1988), митотического веретена раннего зародыша немертины Cerebratulus (Freeman, 1978).

В то же время асимметрия расположения митотического или мейотического веретена, обеспечивающая количественную и качественную асимметрию деления, зависит от фиксации одного из полюсов веретена кортексом, что прослежено при отделении микромеров у морского ежа (Dan, 1984), моллюска Spisula (Dan, Ito, 1984) и мейотическом делении ооцитов шпорцевой лягушки (Рябова и др., 1984) и мыши (Longo, 1985); показано также, что обработка цитохалазином нарушает связь веретена с кортексом. В свою очередь, метафазные мейотические хромосомы в ооците мыши способны индуцировать локальную концентрацию актина в прилежащих участках кортекса (Maro et al., 1986).

По всей вероятности, после установления анизотропии кортикального слоя измененное состояние кортекса влияет на ориентацию системы микротрубочек. По-видимому, для взаимодействия системы микротрубочек и кортикальной цитоскелетной сети яйцевых клеток характерны двусторонние или по крайней мере координированные влияния (Schroeder, 1986). Координированность функционирования систем микротрубо-

чек и актиновых филаментов необходима и для успешного осуществления событий оплодотворения и раннего развития (Schatten, Schatten, 1986; Sawada, Schatten, 1988).

Система промежуточных филаментов обнаружена в ооцитах различных животных: морского ежа (Boyle, Ernst, 1989), морской звезды (Schroeder, Otto, 1991), шпорцевой лягушки (Godsave et al., 1984a,b; Klymkowsky et al., 1987), хомячка (Plancha et al., 1989). У шпорцевой лягушки в ходе оогенеза возникает сеть филаментов цитокератина и виментина с отчетливой асимметрией распределения вдоль анимально-вегетативной оси ооцитов и характерной локализацией цитокератиновых филаментов преимущественно в кортикальном слое яиц, а виментиновых – главным образом в эндоплазме вегетативного полушария (Godsavė et al., 1984a,b; Klymkowsky et al., 1987). В ооцитах других животных выявлены кортикальные филаменты цитокератина, поляризованность организации которых по анимально-вегетативной оси ооцита отчетливо выражена у морского ежа (Boyle, Ernst, 1989) и морской звезды (Schroeder, Otto, 1991). Сеть цитокератиновых филаментов разрушается при созревании ооцита, и в зрелых яйцах исследованных животных не найдено развитой связной системы промежуточных филаментов. Подобным образом исследование с применением моноклональных антител к цитокератину выявило в яйцах мыши диффузный, пятнистый паттерн распределения, но не полимеризованные филаменты (Lehtonen, 1985). Антитела к цитокератину окрашивают в ооцитах морской звезды, помимо кортикальной системы филаментов, пару центросом, расположенных на анимальном полюсе (Schroeder, Otto, 1991). С помощью моноклональных антител к белкам промежуточных филаментов дрозофилы обнаружена локализация одного из реагирующих белков лишь в центросоме яиц морского ежа (Schatten et al., 1987).

Функция промежуточных филаментов и их белков в яйцевых клетках остается наименее ясной. Данные же о морфофункциональной организации системы актиновых филаментов, интегрированной с системой микротрубочек, свидетельствуют о ключевой роли кортикального фибриллярного актина в установлении и поддержании пространственной анизотропии яйцевой клетки – проморфологии будущего зародыша.

ОРГАНИЗАЦИЯ КОРТИКАЛЬНОГО СЛОЯ ЯИЦ И ООЦИТОВ НЕКОТОРЫХ ИГЛОКОЖИХ

Весьма детально исследована структура кортикального слоя яиц и ее реорганизация после контакта гамет у иглокожих, главным образом у морского ежа (обзоры: Schatten, 1984; Schroeder, 1986; Sardet, Chang, 1987). Контакт яйца со спермием запускает каскад связанных с оплодотворением событий, включающих существенную перестройку кортекса за счет сборки актиновых филаментов и их пучков, что ведет к формированию кортикального цитоскелетного каркаса, связанного с более редко и рыхло расположенными филаментами эндоплазмы (Spudich, Spudich,

1979; Tilney, Jaffe, 1980; Coffe et al., 1982; Moon et al., 1983; Sardet, 1984). Сборка структурных элементов кортикального цитоскелета сопряжена с концентрацией в кортексе оплодотворенных яиц морского ежа полимеризованного актина; вместе с актином в кортексе оплодотворенного яйца существенно возрастает количество полимеризованного фасцина, белка, связывающего актиновые филаменты в пучки и локализованного в микроворсинках (Otto et al., 1980; Bryan, 1982; Kane, 1982; Schatten, 1984), а также двух других актинсвязывающих белков: альфа-актинина (Mabuchi et al., 1985; Hamaguchi, Mabuchi, 1986) и фодрина (Schatten et al., 1986c). Эти структурные перестройки происходят у морского ежа в течение нескольких первых минут вслед за осеменением (Tilney, Jaffe, 1980) и нарушаются цитохалазином (Banzhaf et al., 1980).

Нами было проведено ультраструктурное и биохимическое исследование кортексов неоплодотворенных и оплодотворенных яиц морского ежа Strongylocentrotus intermedius (Дроздов и др., 1987). Результаты этой работы, подтверждая полученные на других видах хорошо документированные данные о сборке актиновых филаментов, их пучков и сетей в кортексе осемененных яиц (Spudich, Spudich, 1979; Tilney, Jaffe, 1980; Sardet, 1984; Schatten, 1984), в то же время свидетельствуют о наличии еще до оплодотворения интегрированной кортикальной цитоскелетной сети, отчетливо выявленной также Чендлером (Chandler, 1984) в неоплодотворенных яйцах S. purpuratus. Несколько позже кортикальный актиновый цитоскелет был исследован в неплодотворенных яйцах S. purpuratus и Lytechinus variegatus и описан как сеть коротких филаментов актина (Henson, Begg, 1988; Spudich et al., 1988).

Полимеризация актина в кортексе яйца после контакта со спермием, по-видимому, зависит от возрастания pH в этот период с 6,8 до 7,2 (Vacquier, 1981; Schatten, 1984; Epel, 1990). По данным Бегга и Ребуна (Begg, Rebhun, 1979), ультраструктура кортикального слоя неоплодотворенных яиц, выделенного при pH 7,3–7,5, становится неотличимой от структуры кортексов оплодотворенных яиц, что свидетельствует о наличии до оплодотворения в кортикальном слое большого количества неполимеризованного актина и сборке его при повышении pH. По нашим данным, изоляция кортекса неоплодотворенных яиц при pH 7,2–7,4 приводит к возрастанию числа микрофиламентов, однако без формирования густой сети их, характерной для оплодотворенного яйца. Добавление же к кортексам неоплодотворенных яиц экзогенного глобулярного актина в условиях, способствующих его полимеризации, ведет к формированию густой сети многочисленных филаментов, связанных со сгущениями аморфного материала, что, вероятно, указывает на роль последнего в инициации сборки филаментов и (или) связывании их концов, т.е. организации пространственного расположения микрофиламентов в кортексе.

Показано, что возрастание количества актина и фасцина в кортексе оплодотворенных яиц примерно на треть обеспечивается цитоплазматическим пулом этих белков, полимеризующихся в кортексе (Otto et al., 1980), а структурное состояние актина в яйцах иглокожих регулируется и модулируется несколькими актинсвязывающими белками (Mabuchi,

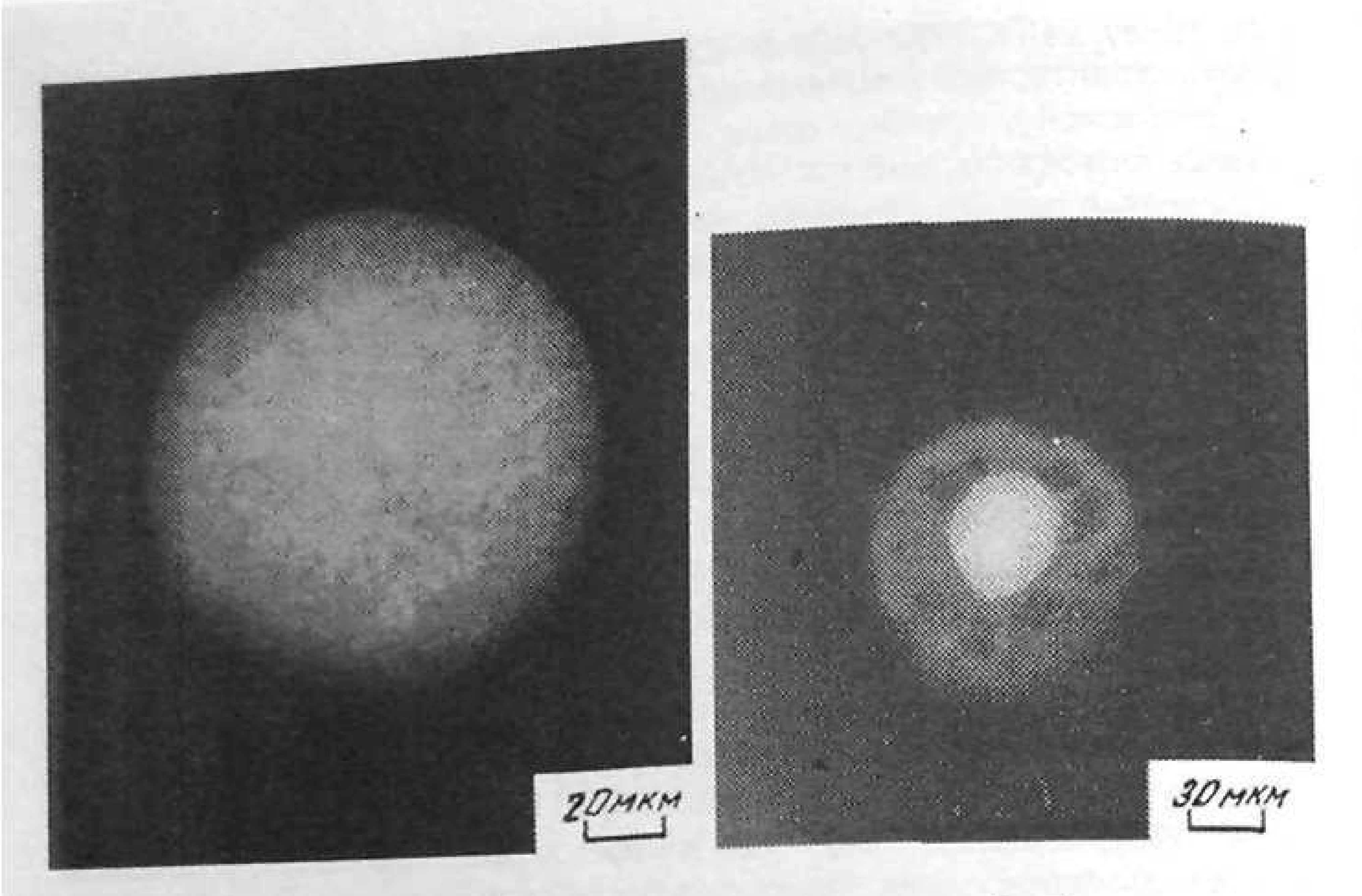


Рис. 1　　　　Рис. 3



Рис. 2

Рис. 1. Фибриллярный актин в зрелом неоплодотворенном яйце морского ежа Echinocardium cordatum (флуоресценция родаминфаллоидина)

Рис. 2. Фибриллярный актин в кортикальном слое ооцита морской звезды Henricia hayashi (флоуресценция родаминфаллоидина)

Рис. 3. Фибриллярный актин в неоплодотворенном яйце моллюска Mactra sulcataria (родамифаллоидин) (Исаева, Преснов, 1990б)

Hosoya, 1983; Mabuchi et al., 1985; Hamaguchi, Mabuchi, 1986; Schatten et al., 1986). По-видимому, помимо моно- или олигомерного актина самого кортекса в организации кортикального цитоскелета участвует и мобилизуемый из эндоплазмы актин; пространственная же организация цитоскелета кортекса оплодотворенного яйца обеспечивается предсуществовавшей структурой кортикального слоя неоплодотворенного яйца.

Механические деформации яиц морского ежа в период формирования ригидного кортикального цитоскелета ведут к появлению геометически необычных форм яиц (Исаева, Преснов, 1983). В течение первых 5 мин после осеменения осуществляется процесс интенсивной полимеризации актина (Dufresne et al., 1987); в это же время яйцеклетки наиболее чувствительны к воздействию цитохалазином (Banzhaf et al., 1980) и наиболее деформируемы механически. Динамика появления яйцеклеток с выступами в ответ на 10-минутное сдавливание очень сходна с динамикой появления этих же форм после 10-минутной обработки цитохалазином (Banzhaf et al., 1980; Исаева, Преснов, 1983). Различие ответа яйцеклеток морского ежа на сжатие в разное время после оплодотворения отражает, по-видимому, динамику становления кортикального цитоскелета.

Кортикальная сеть фибриллярного актина может быть визуализирована и путем окрашивания родаминфаллоидином после экстракции тритоном *X-100 как тотальных препаратов яиц морского ежа (Echinocardium* cordatum – рис. 1), так и изолированных кортексов яиц морского ежа или ооцитов морской звезды Henricia hayashi (рис. 2); фибриллярная сеть более отчетливо различима на препаратах кортикального слоя яйцевых клеток. Поскольку в отличие от морского ежа у мидии (представителя двустворчатых моллюсков) в кортикальном слое яиц найдено значительно большее количество полимеризованного актина до оплодотворения (Дроздов и др., 1987), техникой окрашивания родаминфаллоидином проведено выявление фибриллярного актина в ооцитах другого двустворчатого моллюска – Mactra sulcataria (рис. 3). Сравнение интенсивности флуоресценции и морфологии кортикальной сети фибриллярного актина в ооцитах и яйцах исследованных представителей иглокожих и двустворчатых моллюсков не дает оснований для заключения о принципиальных качественных отличиях организации кортекса яйцевых клеток этих типов животных.

Ориентация основной оси поляризованного яйца (анимально-вегетативной у животных), будучи преемственной в ходе развития, детерминирует ось зародыша и в конечном итоге ось взрослого организма. Для исследования осевого паттерна яйцевых клеток необходимы надежные маркеры полярности яиц и зародышей. Маркером анимального полюса яиц и зародышей морского ежа может служить микропилярный канал в студенистой оболочке (Schroeder, 1980a), однако необходимость удаления студенистой оболочки в экспериментах не позволяла использовать этот маркер. У средиземноморского ежа Paracentrotus (Strongylocentrorus) lividus ориентация анимально-вегетативной оси маркируется возникающим в ходе раннего дробления (а у 20% яиц – еще до оплодотворения) характерным распределением кортикальных пигментных гранул с диско-

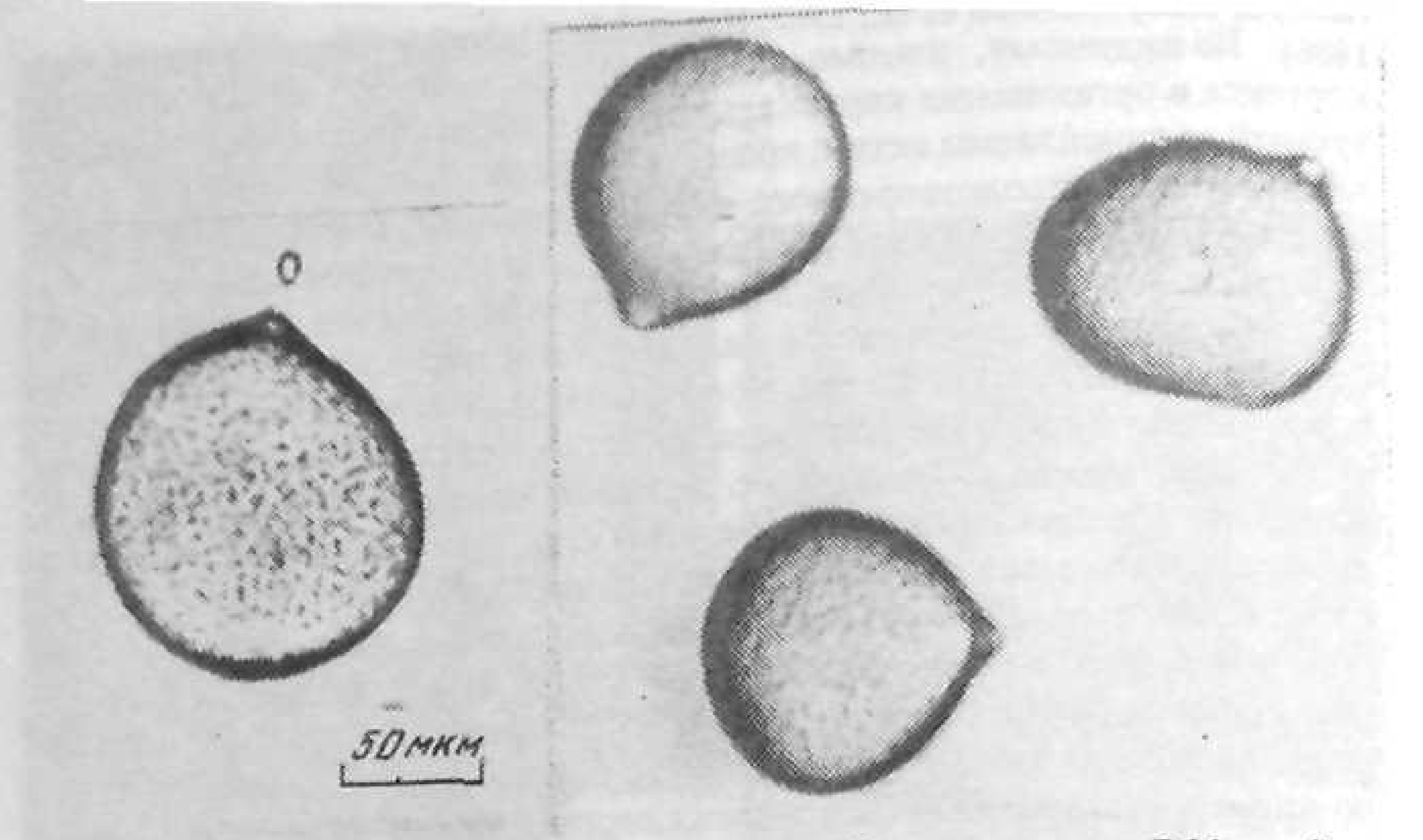


Рис. 4. *Отделение полярного тельца* при созревании яйца морского ежа Echinocardium cordatum

Рис. 5. Типичная морфология зрелых неоплодотворенных яиц E. cordatum

видной зоной (свободной от пигмента) на *вегетативном полюсе* (*Schroeder*, 1980b). Яйца немногих других видов ежей тоже имеют подобную естественную маркировку вегетативного полюса и анимально-вегетативной оси (Schoroeder, 1980b; Tanaka, 1981). Echinocardium cordatum – один из очень немногих видов морских ежей, зрелые неоплодотворенные яйца которых обладают морфологическим маркером анимального полюса яйца (Monnè, 1946) в виде сосочковидного выступа. Наличие такого маркера позволило провести исследование распределения фибриллярного актина *и других особенностей поляризованной* организации неоплодотворенных яиц E. cordatum (см.: Исаева, Преснов, 1990а).

После выделения из яичника готовых к созреванию ооцитов E. cordatum (в мае-июне) наблюдается их массовое созревание в морской воде с отделением *полярных телец* (рис. 4). *После* отделения второго полярного тельца на анимальном полюсе зрелого яйца остается отчетливый выступ (рис. 5), сохраняющийся вплоть до оплодотворения. Лишь у зрелых яиц в конце сезона размножения (август) маркер анимального полюса обычно отсутствует, яйца имеют обычную *для яиц* морских ежей сферическую или неправильно-округлую форму.

При помещении зрелых яиц E. cordatum в суспензию частиц туши отчетливо выявляется микрополе – канал в студенистой оболочке, ведущей к анимальному полюсу (рис. 6). В *гипотонической* среде (*разбавление* морской воды дистиллированной 3:1) на анимальном полюсе неоплодотворенных яиц E. cordatum появляется и достигает большого размера выступ, в который перетекает до трети объема ооплазмы (рис. 7).

Исследование распределения *фибриллярного актина* техникой *окра-*

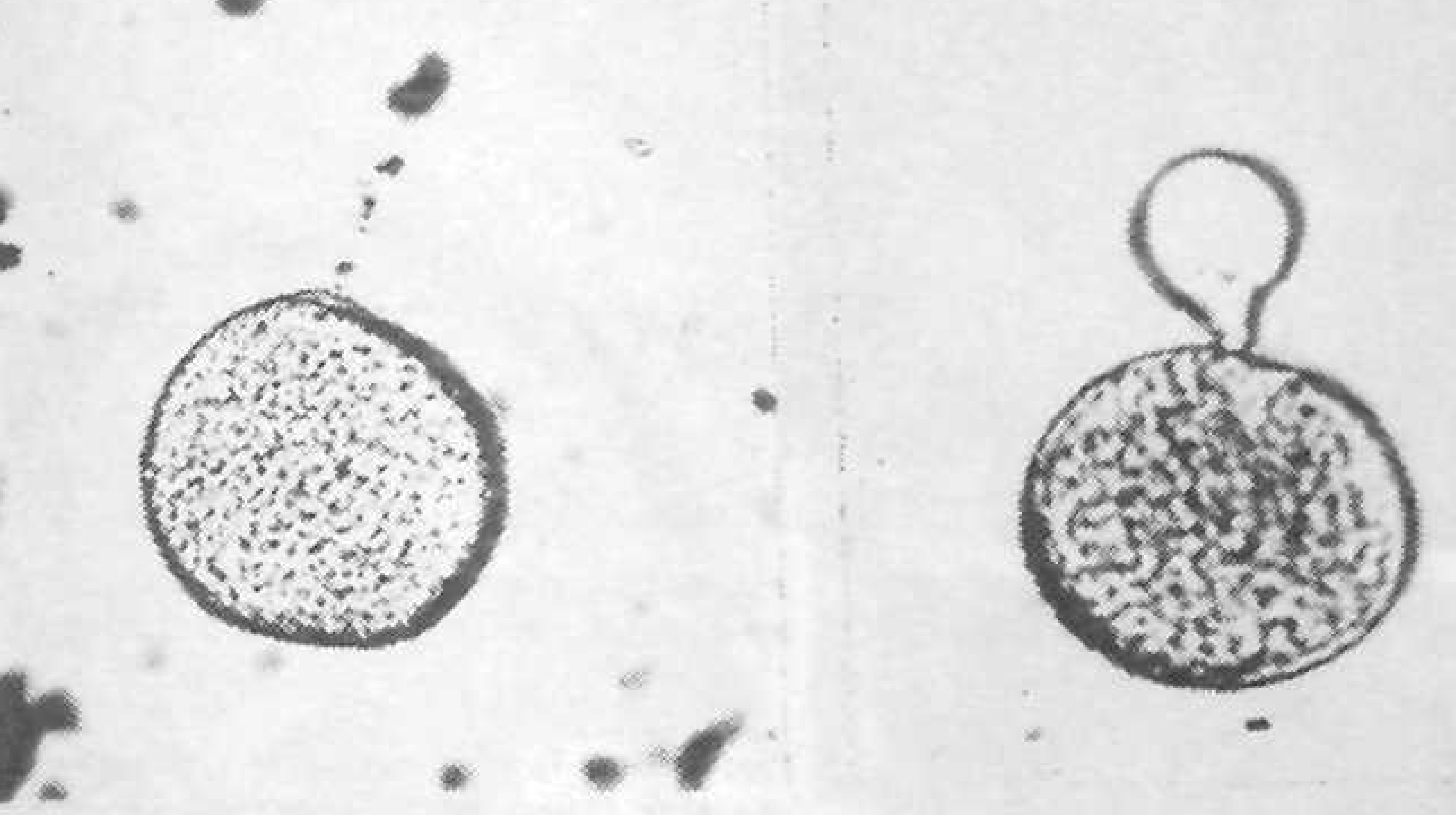


Рис. 6. Визуализация микропиле в студенистой оболочке неоплодотворенного яйца *E. cordatum* (*суспензия частиц туши*)

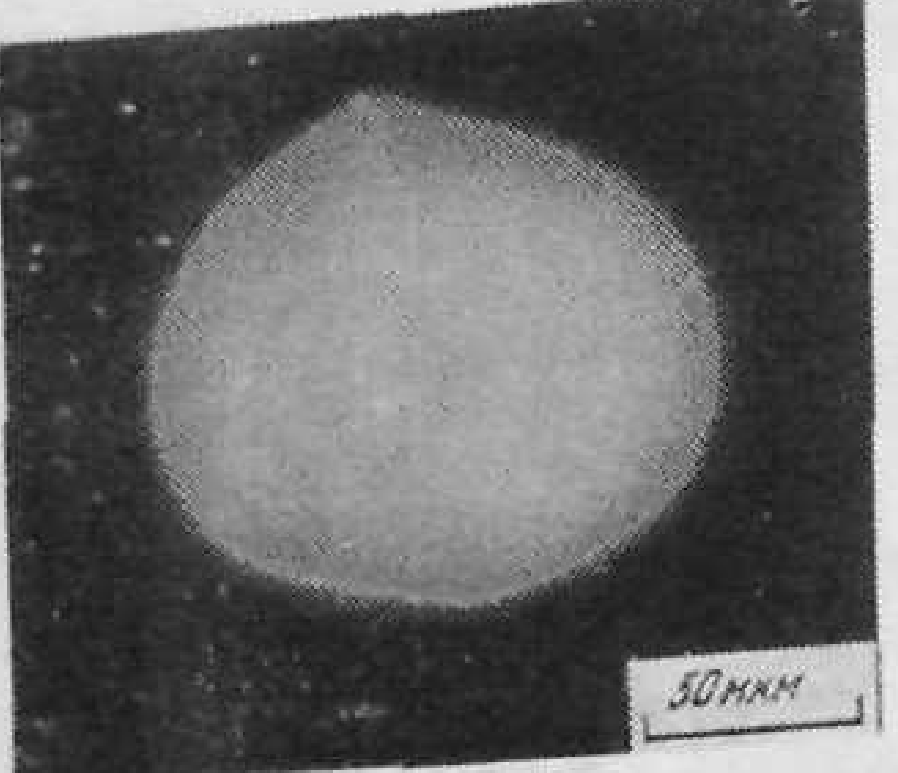
Рис. 7. Ооплазматическая лопасть на анимальном полюсе яйца E. cordatum в гипотонической среде

шивания родаминфаллоидином выявило отчетливую концентрацию актина в кортикальном слое яиц с падением интенсивности флуоресценции в области анимального полюса при локальном возрастании яркости свечения на вершине "носика" – выступа (рис. 8). У зрелых яиц конца сезона размножения фибриллярный актин создает однородный мелкопятнистый паттерн распределения по всему кортексу (см. рис. 1), причем пятна более яркой флуоресценции, по-видимому, соответствуют микроворсинкам поверхности яйца.

Вслед за вхождением спермия в яйцо E. cordatum в течение 1-й минуты отделяется оболочка оплодотворения, иногда соответствующая своими очертаниями (выступ на стороне анимального полюса) форме неоплодотворенного яйца (рис. 9), само же яйцо в это время становится сферическим. В последующие 2–3 мин в месте вхождения спермия возникает хорошо заметный конус оплодотворения, *сначала конической*, а затем округлой формы, исчезающий примерно через 5 мин после осеменения. Окрашивание родаминфаллоидином выявило яркую флуоресценцию конуса оплодотворения (рис. 10).

Вследствие наличия у яиц E. cordatum четкого морфологического маркера анимального полюса неоплодотворенности яйца и хорошо заметного конуса оплодотворения можно проследить положение места вхождения спермия относительно полюса яйца. Результаты наблюдений с регистрацией позиции *анимального полюса до осеменения и затем* места появления конуса оплодотворения у каждой из 57 яйцеклеток показали, что спермий способен проникнуть в яйцо E. cordatum в любой точке поверхности яйца, за исключением области анимального полюса.

Ко времени созревания ооциты E. cordatum открепляются от стенки яичника, оказываясь свободно лежащими в просвете ацинуса, и утрачи-



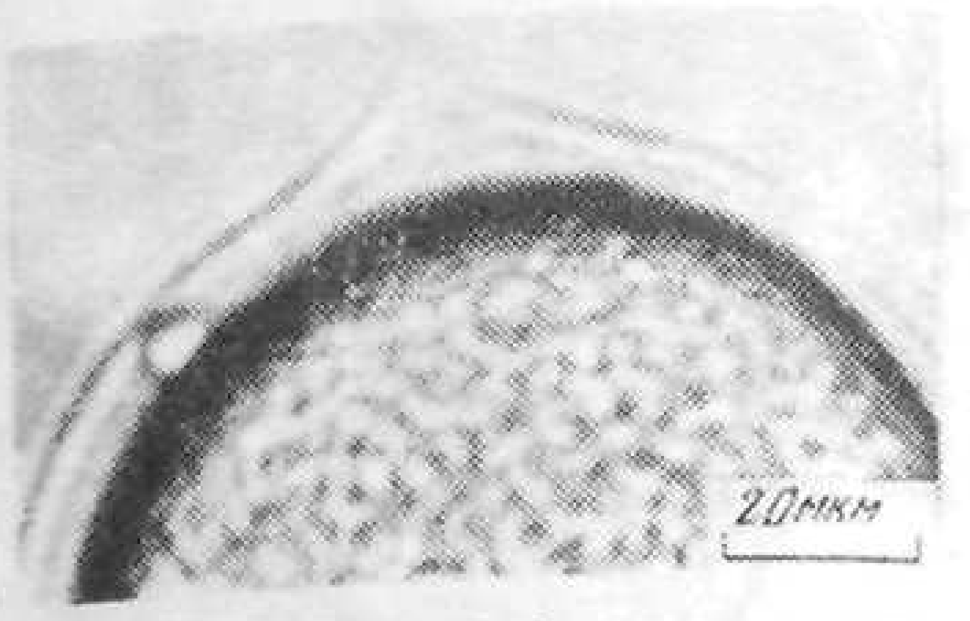


Рис. 8. Распределение фибриллярного актина в яйце E. cordatum (родаминфаллоидин)

Рис. 9. Яйцо E. cordatum через 3 мин после контакта гамет: конус оплодотворения и оболочка оплодотворения, воспроизводящая очертания анимального полюса неоплодотворенного яйца

Рис. 10. Флуоресценция конуса оплодотворения яйца E. cordatum (родаминфаллоидин)

вают морфологический маркер бывшего места прикрепления ооцита. Поэтому проследить с достоверностью преемственность полюсов прикрепленного ооцита и свободно лежащего в просвете ацинуса яичника или в морской воде вне организма не представляется возможным.

Поскольку анимально-вегетативная полярность яйца у животных детерминируется в ходе оогенеза, поиски механизма становления полярности яйца должны быть обращены именно к этому периоду. Ориентация оси яйцевой клетки, насколько известно, зависит от анизотропии окружающей ооцит среды, т.е. его контактов с клеточными и внеклеточными структурами яичника. В связи с представлениями о роли контактных взаимодействий ооцита с клеточными и внеклеточными структурами яичника в интегральной реакции поляризации яйцевой клетки и о функционировании сети актиновых филаментов как субстрата – носителя эпигенетической памяти яйца (см. ниже, а также: Исаева, Преснов, 1987; Исаева, 1990а) кажется заслуживающим внимания исследование организации именно актинового цитоскелета ооцитов.

Техникой окрашивания родаминфаллоидином изучено распределение фибриллярного актина в вителлогенных ооцитах с естественными морфологическими маркерами полярности у морских ежей Strongylocentrotus nudus и Echinocardium cordatum и морской звезды Henricia hayashi (Исаева, Преснов, 1990б).

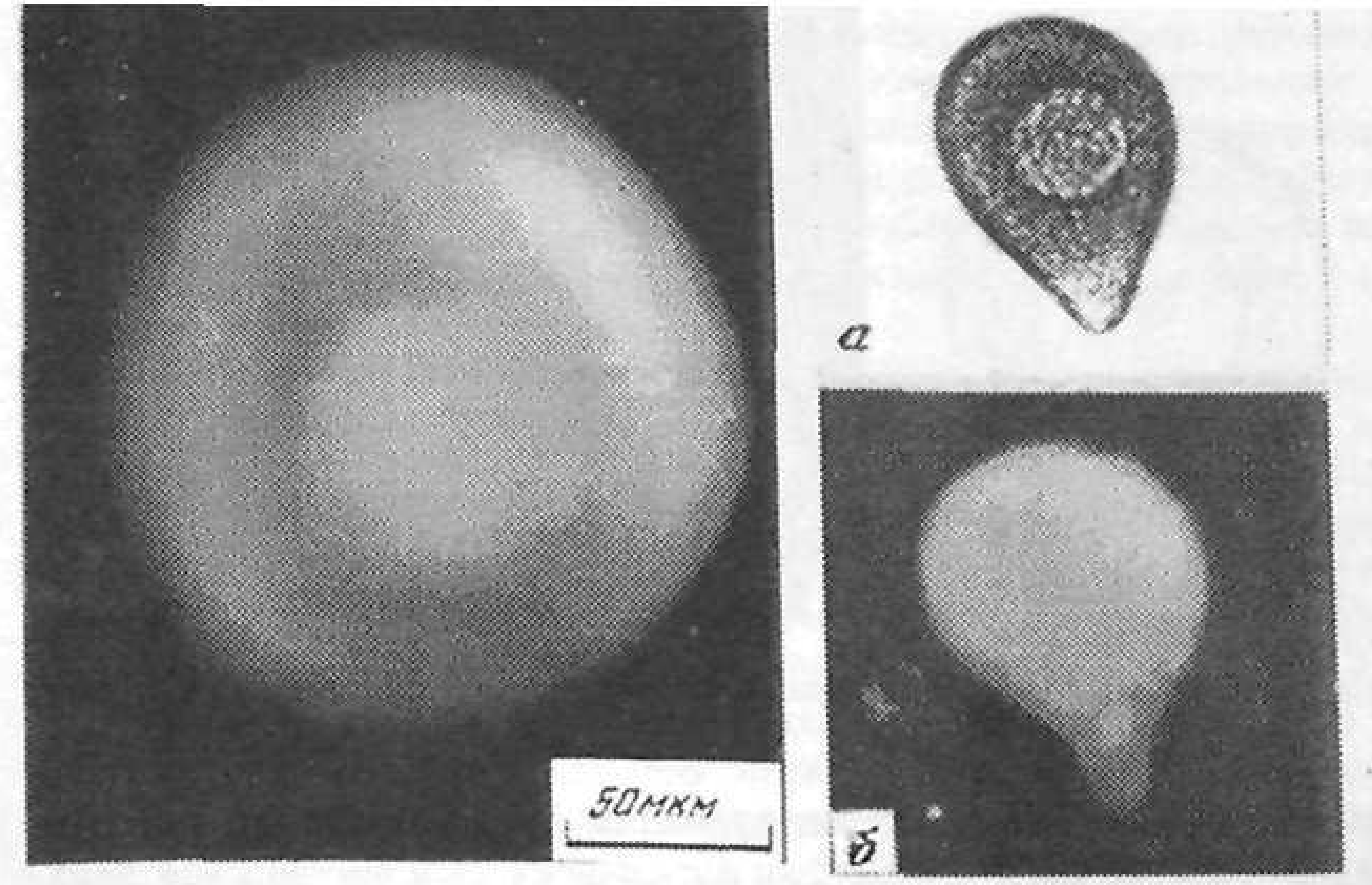


Рис. 11. Поляризованное распределение фибриллярного актина в ооците H. hayashi: родаминфаллоидин (Исаева, Преснов, 1990б)

Рис. 12. Ооциты S. nudus
а – в морской воде; *б* – окраска родаминфаллоидином (Исаева, Преснов, 1990б)

У ооцитов всех исследованных нами видов животных найдены диффузная флуоресценция ооплазмы, наиболее интенсивная в ее кортикальном слое, а также интенсивное свечение ядра.

Наиболее отчетливая поляризованность интенсивности ооплазматической флуоресценции выявлена в ооцитах морской звезды Henricia hayashi. Полярность ооцитов H. hayashi морфологически маркирована более или менее выраженным локальным выступом (лопастью) в месте прикрепления ооцита и общей грушевидной либо "яйцевидной" формой ооцита. В ооцитах ранних этапов вителлогенеза интенсивность ооплазматической флуоресценции, наиболее яркой в кортексе, отчетливо и весьма резко падает по направлению к полюсу прикрепления. Большей яркостью флуоресценции отличается от окружающей эндоплазмы и ядро ооцита (рис. 11). У ооцитов конечных этапов вителлогенеза при сплошной яркой флуоресценции кортикального слоя лишь маркирующая место бывшего прикрепления лопасть поверхности оказывается слабо светящейся, причем и здесь выделяется большей интенсивностью флуоресценции тонкий кортикальный слой.

Небольшие вителлогенные ооциты морского ежа Strongylocentrotus nudus имеют грушевидную форму с отростком (ножкой), маркирующим полюс прикрепления ооцита (рис. 12,*а*). Диффузная или мелкопятнистая флуоресценция более интенсивна в кортикальном слое, убывая по направлению к полюсу прикрепления, с очень слабым свечением "нож-

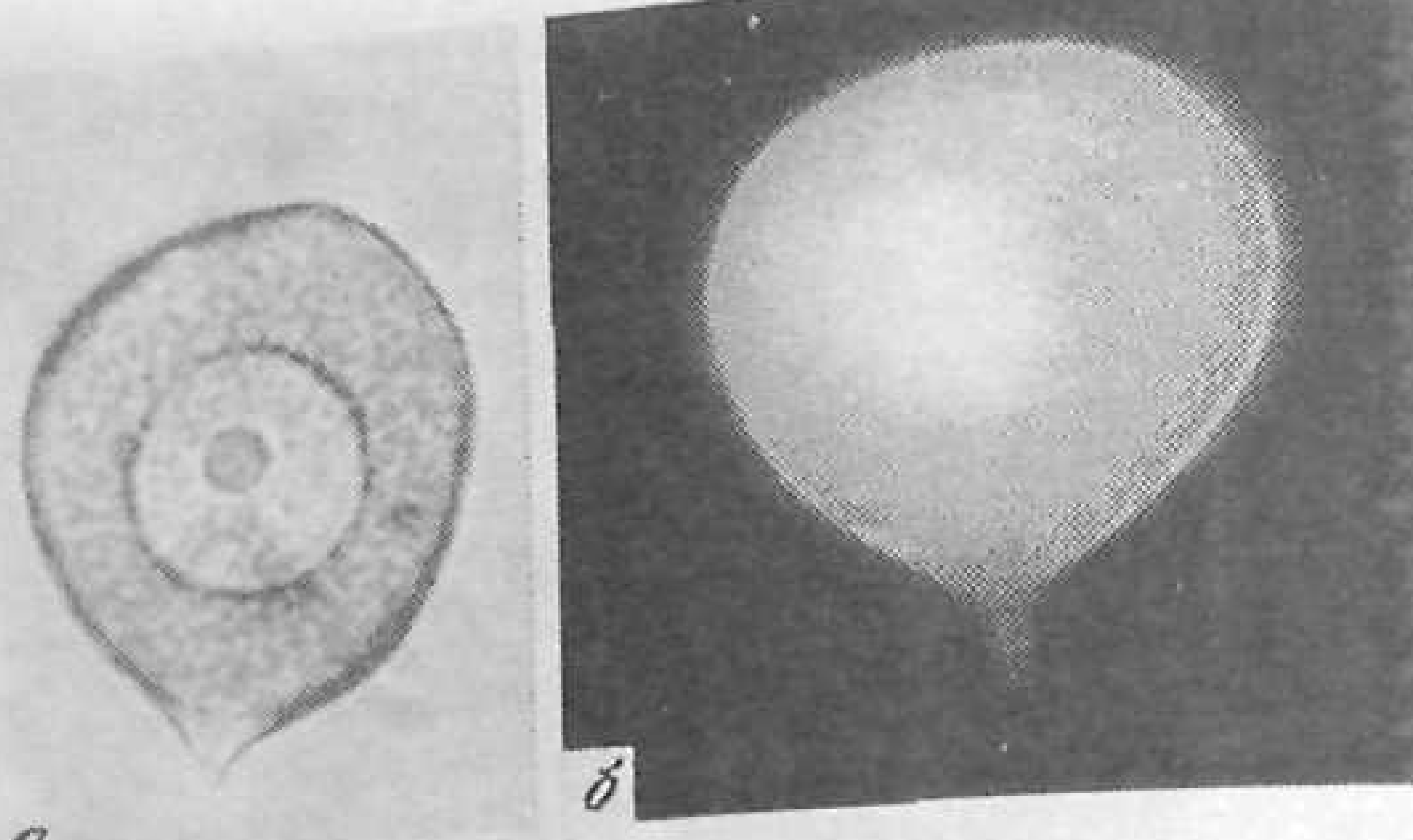


Рис. 13. Ооциты E. cordatum
а — в морской воде; б — окраска родаминфаллоидином (Исаева, Преснов, 1990б)

ки" ооцита (рис. 12,б). Ядерная локализация флуоресценции в ооцитах S. nudus слабо выражена.

Ооциты морского ежа Echinocardium cordatum были исследованы на стадиях завершения вителлогенеза и созревания; доля ооцитов, сохранивших морфологический маркер прикрепления ооцита в яичнике (рис. 13,а), невелика. У таких ооцитов диффузная флуоресценция ооплазмы сконцентрирована в кортикальном слое, интенсивно флуоресцирует и ядро. Осевой градиент распределения яркости свечения отсутствует, но выступ ("стебелек") прикрепления отличается значительно более слабой флуоресценцией, причем свечение на его вершине несколько ярче, чем у более широкого основания выроста (рис. 13,б).

Фаллоидин, как известно, с высокой специфичностью связывается с актиновыми филаментами и ингибирует их деполимеризацию. Флуоресцирующие производные фаллоидина выявляют локализацию фибриллярного актина в клетке, причем при насыщающих концентрациях интенсивность флуоресценции пропорциональна количеству фибриллярного актина (Cooper, 1987; Cano et al., 1992).

Ооплазматическая (преимущественно кортикальная) локализация актина в виде сети актиновых филаментов выявлена в яйцевых клетках всех исследованных в этом аспекте животных, и в частности иглокожих (Sardet, 1984; Yonemura, Kinoshita, 1986; Sardet, Chang, 1987). Кортикальная сеть фибриллярного актина связана с пучками актиновых филаментов, составляющих цитоскелетную основу небольших и коротких микроворсинок поверхности, существенно удлиняющихся лишь после оплодотворения яиц морских ежей или созревания ооцитов морских звезд (обзоры: Schroeder, 1986; Sardet, Chang, 1987). Флуоресценция кортикального слоя окрашенных родаминфаллоидином неоплодотворенных яиц морского ежа менее интенсивна по сравнению с таковой оплодотворенных яиц (Yonemura, Kinoshita, 1986; Henson, Begg, 1988; Spudich et al., 1988). Подобная флуоресценция диффузного характера выявлена в кортикальном

слое ооцитов и неоплодотворенных яиц морских ежей. Вероятно, микроворсинки поверхности вителлогенных ооцитов и зрелых неоплодотворенных яиц Echinocardium cordatum вскоре после созревания слабо выражены, что и обусловливает диффузный характер флуоресценции кортикального слоя. Лишь у зрелых яиц E. cordatum, уже утративших морфологический маркер полярности, обнаружен пятнистый паттерн флуоресценции, по-видимому отражающий распределение микроворсинок.

Очевидно, область анимального полюса неоплодотворенных яиц E. cordatum отличается морфологическими и функциональными особенностями от остальной поверхности яйца. Известно, что у ооцитов морской звезды область анимального полюса лишена микрошипиков поверхности (цитоскелетную основу которых, как и микроворсинок, составляет пучок актиновых филаментов) и связанных кортикальной цитоскелетной сетью мембранных пузырьков (Schroeder, 1986, 1988). Таким образом, в области анимального полюса найдено локальное ослабление ригидного кортикального цитоскелета ооцитов морской звезды. Вероятно, подобное отсутствие микроворсинок поверхности и плотного кортикального сплетения актиновых филаментов в области анимального полюса неоплодотворенных яиц морского ежа E. cordatum обусловливает и локальное падение интенсивности флуоресценции родаминфаллоидина, и выпячивание ооплазмы на анимальном полюсе, резко усиливающееся в условиях гипотонии. Повышение же концентрации фибриллярного актина на вершине анимального конуса, вероятно, след локальной концентрации актина в зоне контакта ооцит–полярное тельце, подобно найденной у ооцитов мыши (Reima, Lehtonen, 1985) и кольчатых червей (Fernandez et al., 1990; Shimizu, 1990).

Отсутствие проникновения спермия в области анимального полюса яиц E. cordatum, вероятно, также свидетельствует о морфофункциональных особенностях этой области. Таким образом, канал в студенистой оболочке яйца – единственный маркер анимального полюса яиц большинства всех остальных видов морских ежей (Schroeder, 1980a) – очевидно, не служит путем прохождения оплодотворяющего спермия у E. cordatum.

Комплекс морфофункциональных особенностей анимального полюса яиц E. cordatum – ясное проявление анимально-вегетативной полярности зрелых неоплодотворенных яиц. У большинства других видов морских ежей экспрессия анимально-вегетативной полярности яйца до оплодотворения не столь явна. Так, поверхность анимального полюса яйца Strongylocentrotus nudus непосредственно после отделения полярных телец (рис. 14) не обладает никакими заметными отличиями от остальной поверхности яйцеклетки. Лишь воздействие цитохалазином выявляет некую поляризацию неоплодотворенного яйца S. nudus (см. рис. 16), соответствие которой анимально-вегетативной оси яйца остается недоказанным.

Анизотропное, поляризованное распределение фибриллярного актина найдено в ооцитах исследованных представителей иглокожих вдоль оси,

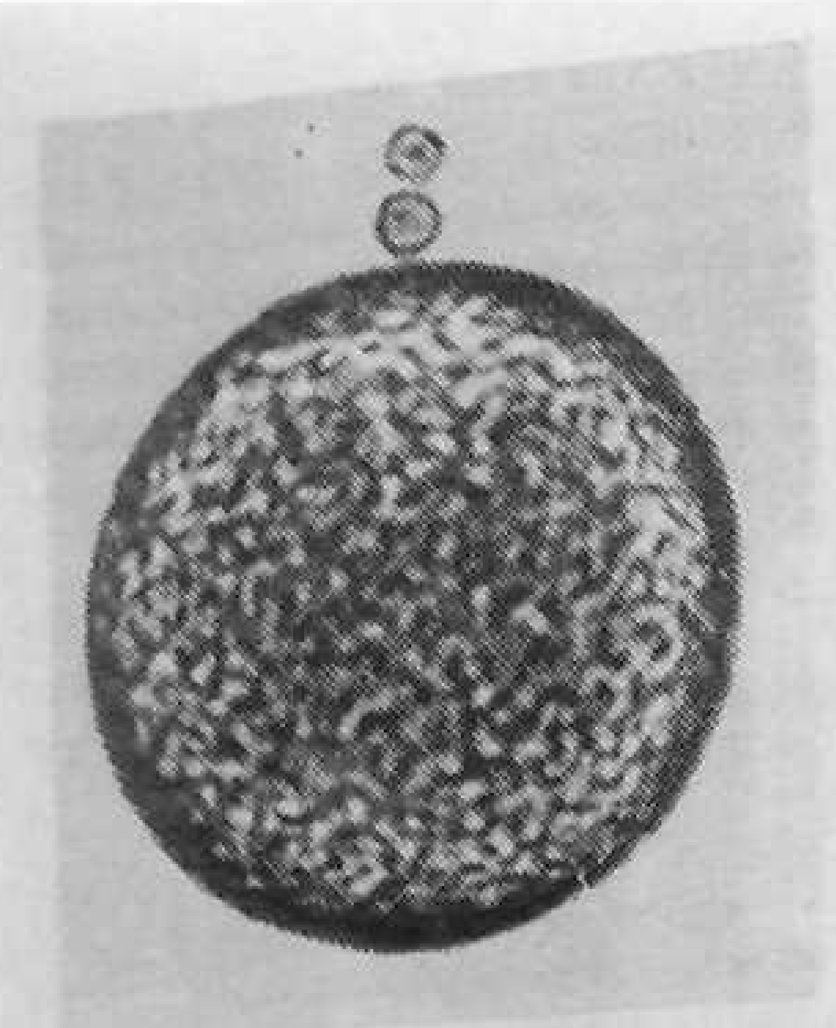


Рис. 14. Яйцо морского ежа S. nudus с полярными тельцами

определяемой местом прикрепления ооцита в яичнике. Наиболее отчетливо поляризованная организация актинового цитоскелета ооплазмы выявлена в ооцитах морской звезды H. hayashi. Этот вид отличается большими размерами яиц, лецитотрофным развитием с выпадением планктотрофной стадии личиночного развития и такими особенностями оогенеза, как амплификация рибосомных генов и образование множественных внехромосомных ядрышек, содержащих рибосомную ДНК (Гагинская и др., 1983; Gaginskaya et al., 1988).

По всей вероятности, в связи с лецитотрофным типом развития этого вида, большим количеством желтка и крупными размерами яиц кортикальная сеть фибриллярного актина в ооцитах H. hayashi значительно более развита по сравнению с ооцитами морских ежей (планктотрофный тип развития – см.: Касьянов, 1989). Кортикальный слой ооцитов H. hayashi характеризуется очень яркой флуоресценцией, а на препаратах изолированного кортекса выявлена мощная сеть фибриллярного актина. По данным Гагинской и др. (1983, 1988), к ядру ооцитов H. hayashi прилегает асимметрично расположенное сплетение филаментов. Такого рода "шапочка" была различима при светооптическом рассмотрении ооцитов H. hayashi после фиксации и экстракции детергентом, однако окрашивание родаминфаллоидином не выявляло этой структуры. Поэтому можно предположить, что околоядерное фибриллярное сплетение в ооцитах H. hayashi образовано промежуточными филаментами. Крупные же размеры яиц и ооцитов этой морской звезды, связанные с упомянутыми выше особенностями оогенеза, делают ее объектом для исследования цитоскелета ооцитов.

Высокая концентрация фибриллярного актина обнаружена и в ядрах ооцитов Henricia hayashi, Echinocardium cordatum и Mactra sulcataria. Актин – мажорный белок клеточных ядер. Данные о внутриядерной локализации актина получены как на соматических клетках (см.: Schindler, Jiang, 1986; Crowley, Brasch, 1987), так и на ооцитах млекопитающих (см.: Thibault et al., 1987), амфибий (Scheer et al., 1984; Scheer, Dabauvalle, 1985; Scheer, 1986) и морского ежа (Spudich et al., 1988). Актиновые филаменты, по-видимому, вовлечены в процессы транскрипции в петлях хромосом типа ламповых щеток ооцитов амфибий (Scheer et al., 1984; Scheer, 1986) и ядерно-цитоплазматический транспорт (Schindler, Jiang, 1986); фибриллярный актин отчетливо выявляется именно в ооцитах с их крупными, функционально активными ядрами.

При несомненной заданности осевых различий поляризованного

распределения фибриллярного актина, как и ориентация анимально-вегетативной оси ооцитов иглокожих, локализацией прикрепления ооцита в яичнике остается неясным конкретное положение анимального и вегетативного полюсов ооцита относительно структур яичника. Маркер анимального полюса яиц – полярное тельце (тельца) появляется у ооцитов иглокожих после потери их контакта со структурами яичника и, как правило, после утраты морфологического маркера полюса прикрепления. Данные о соответствии места прикрепления ооцита анимальному или же, наоборот, вегетативному полюсу яйца иглокожих противоречивы и основаны главным образом на косвенных фактах (см.: Равен, 1964; Иванова-Казас, 1978; Schroeder, 1980; Smiley, Cloney, 1985). Лишь для голотурии Stichopus californicus прослежена преемственность полюсов и установлено соответствие морфологически маркированного места прикрепления ооцита к фолликулярному эпителию анимальному полюсу яйца (Smiley, Cloney, 1985).

Так или иначе, локализация места прикрепления ооцита в яичнике детерминирует возникновение локальной же особенности организации кортикальной сети фибриллярного актина и глобальной поляризации его распределения в яйцевой клетке.

ПАРАДОКСАЛЬНЫЙ ЭФФЕКТ ЦИТОХАЛАЗИНА: АКТИВАЦИЯ ЯИЦ И АМЕБОИДНАЯ ПОДВИЖНОСТЬ ООПЛАЗМЫ

Итак, становление и поддержание анизотропии ооплазмы, по-видимому, зависит прежде всего от морфофункциональной организации кортикальной сети фибриллярного актина. Цитохалазины, нарушающие, как известно, структуру и функции актиновых филаментов, широко применяются в качестве ингибиторов различных зависимых от актиновых филаментов проявлений клеточной и субклеточной подвижности, в частности, оплодотворения и цитотомии, что весьма подробно исследовано на морском еже (Longo, 1980, 1986; Schatten, Schatten, 1981; Schatten, 1982, 1984; Cline et al., 1983; Schroeder, 1986); подобный же эффект оказывает латрункулин (Schatten, Schatten, 1986; Schatten et al., 1986b). Цитохалазин подавляет и амебоидную подвижность яйцевых клеток, что было показано при исследованиях подвижности ооцитов моллюска Spisula (Rebhun, 1975; Carroll, Eckberg, 1986). Мы применили обработку цитохалазином B с иной целью: индукции амебоидной подвижности яиц морского ежа; предполагалось, что нарушение цитохалазином нормальной организации ригидного кортикального цитоскелета может привести после отмывки ингибитора к двигательной активности яиц, что и наблюдали в действительности наряду с неожиданным эффектом цитохалазина как активирующего агента (Исаева, Чуриков, 1988а). Подобное действие (при некоторой специфичности эффекта) оказывал и цитохалазин D.

В растворах цитохалазина D при концентрациях 5–20 мкг/мл или цитохалазина D (2–5 мкг/мл) через 8–9 мин происходит интенсивное, хорошо заметное сокращение кортекса и отделение оболочки оплодотворения у

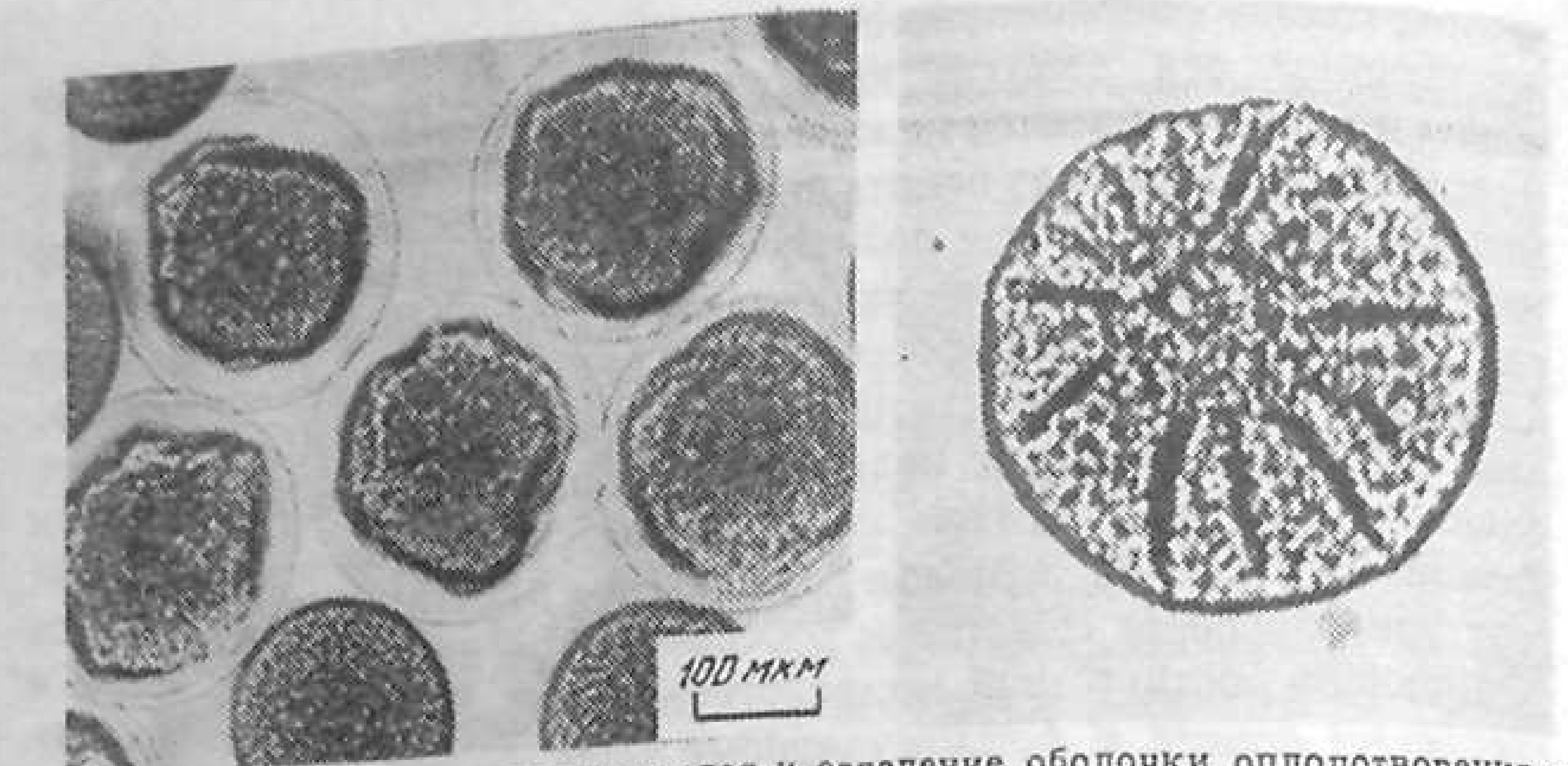


Рис. 15. Сокращение кортикального слоя и отделение оболочки оплодотворения у яиц S. nudus в растворе цитохалазина B (5 мкг/мл, 8 мин) (Исаева, Чуриков, 1988а)

Рис. 16. Радиальное расположение складок кортикального слоя яйца S. nudus в растворе цитохалазина D (5 мкг/мл)

неоплодотворенных яиц морского ежа Strongylocentrorus nudus (рис. 15) и Echinocardium *cordatum*. Доля реагирующих таким образом яиц возрастала с увеличением концентрации раствора цитохалазина в указанных пределах. Вскоре яйца приобретали характерную для обработанных цитохалазином яиц грубоструктурированную морфологию кортекса, кортикальная подвижность прекращалась. Более длительное пребывание яиц S. nudus в растворах цитохалазина D (в течение 1–2 ч) обычно приводило к появлению хорошо заметных статичных складок поверхности, нередко радиально расположенных (рис. 16).

10-минутная обработка яиц ингибитором с последующей его отмывкой вызывала амебоидную подвижность 10–90% яиц (данные о зависимости доли яиц с подвижной ооплазмой от концентрации цитохалазина B см.: Исаева, Чуриков, 1988а). Разнообразные проявления амебоидной подвижности (периодические сокращения кортекса, образование псевдоподий различного размера и формы) были свойственны яйцам как отделившим, так и не отделившим оболочку. У яиц, отделивших оболочку, подвижность либо протекала внутри ее, либо приводила к разрыву гиалинового слоя и оболочки оплодотворения, образованию большой псевдоподии и выползанию ооплазмы из яйцевых оболочек (рис. 17). Гиалиновый слой и оболочка оставались связанными с небольшим сферическим фрагментом яйца, часто отрывающимся от основной массы ооплазмы.

Наблюдались две основные формы подвижности, различавшиеся скоростью видимых изменений морфологии яиц и чувствительностью к повторному воздействию цитохалазина. "Быстрая" подвижность проявлялась в разнообразных изменениях формы, регистрируемых при наблюдении и фотографировании с интервалами от 30 с до нескольких минут (см. рис. 17). В некоторых случаях заметные изменения формы с сопутствующим видимым перетеканием эндоплазмы осуществлялись еще

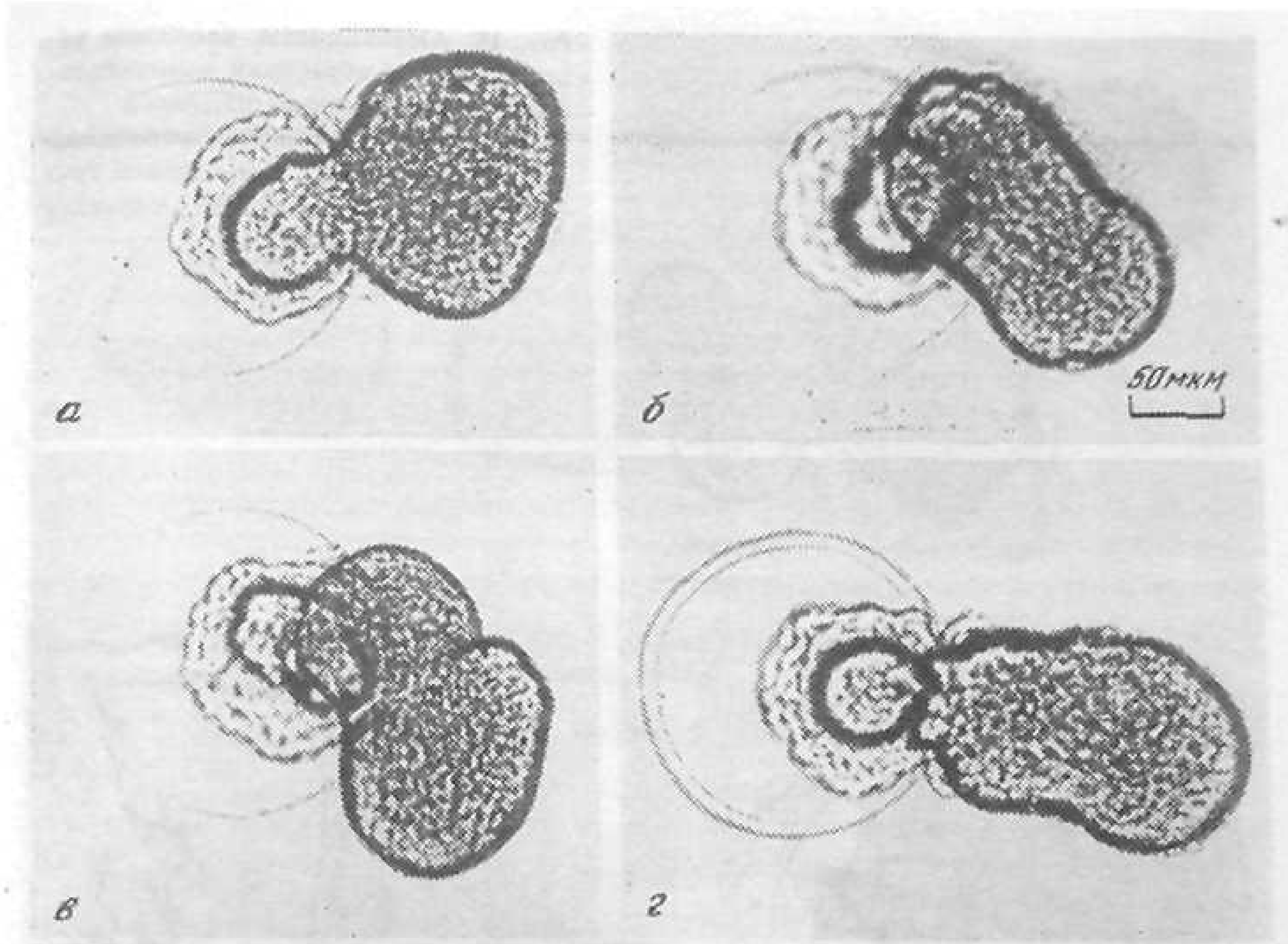


Рис. 17. Амебоидная подвижность яйца S. nudus, обработанного цитохалазином B (10 мкг/мл, 10 мин) через 1 ч 30 мин *(а)*, 1 ч 31 мин *(б)*, 1 ч 31 мин 30 с *(в)*, 1 ч 32 мин *(г)* после отмывки (Исаева, Чуриков, 1988а)

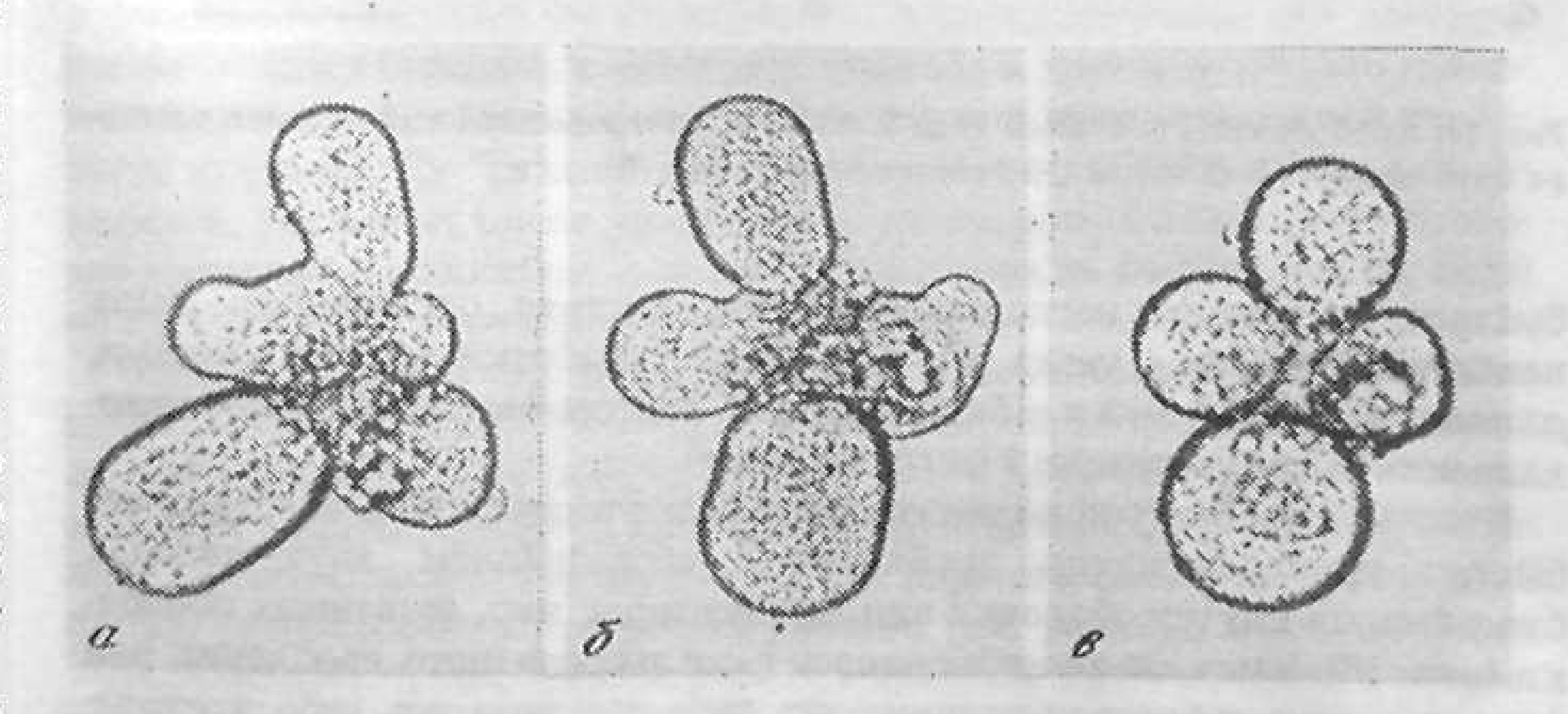


Рис. 18. Фрагментация яйца S. nudus после обработки цитохалазином B (10 мкг/мл, 10 мин) через 1 ч 50 мин *(а)*, 1 ч 51 мин *(б)*, 1 ч 52 мин *(в)* после отмывки (Исаева, Чуриков, 1988а)

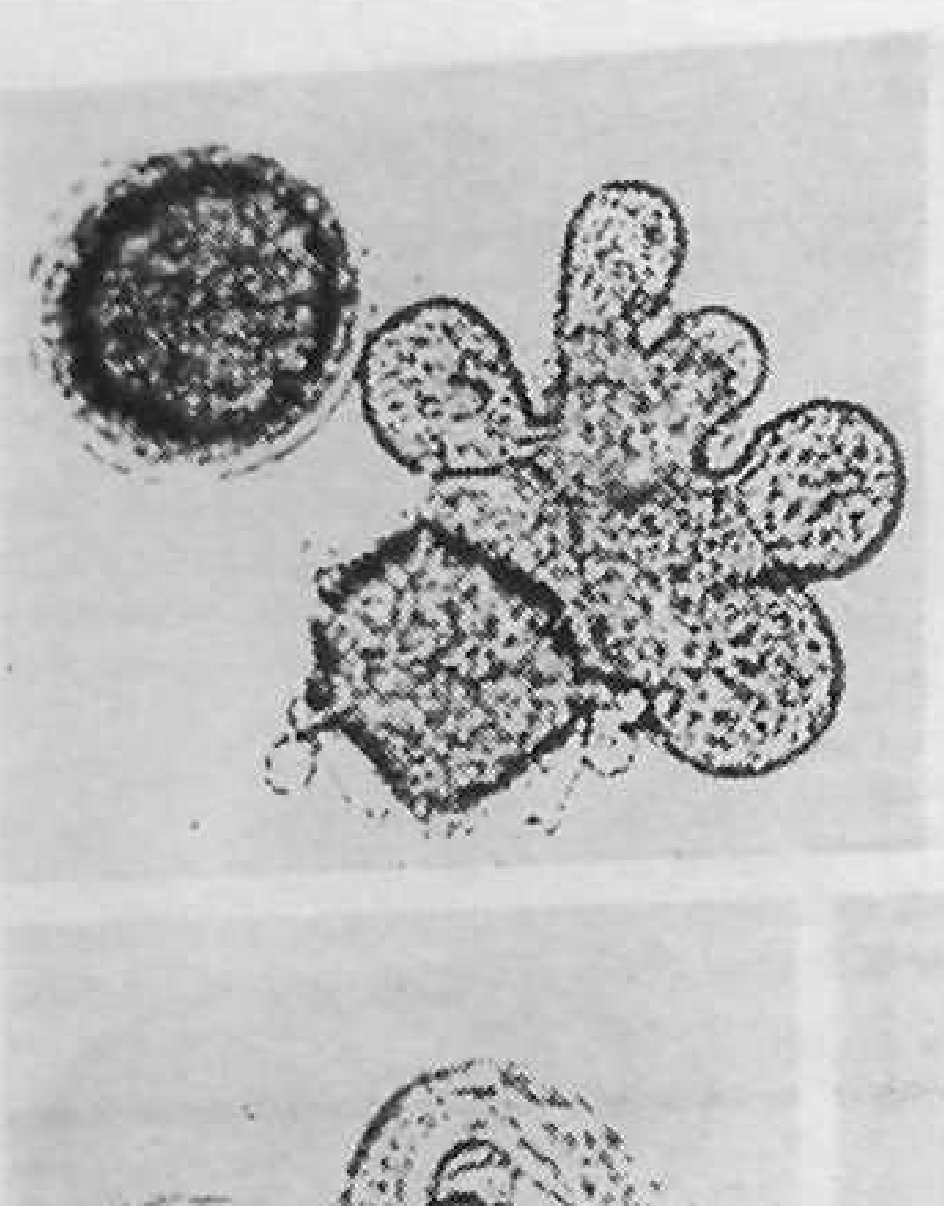


Рис. 19. Амебоидность ооплазмы через 6 ч после обработки цитохалазином В с последующей отмывкой

Рядом – сферическое неподвижное яйцо S. nudus с характерной грубозернистой структурой кортекса (Исаева, Чуриков, 1988а)

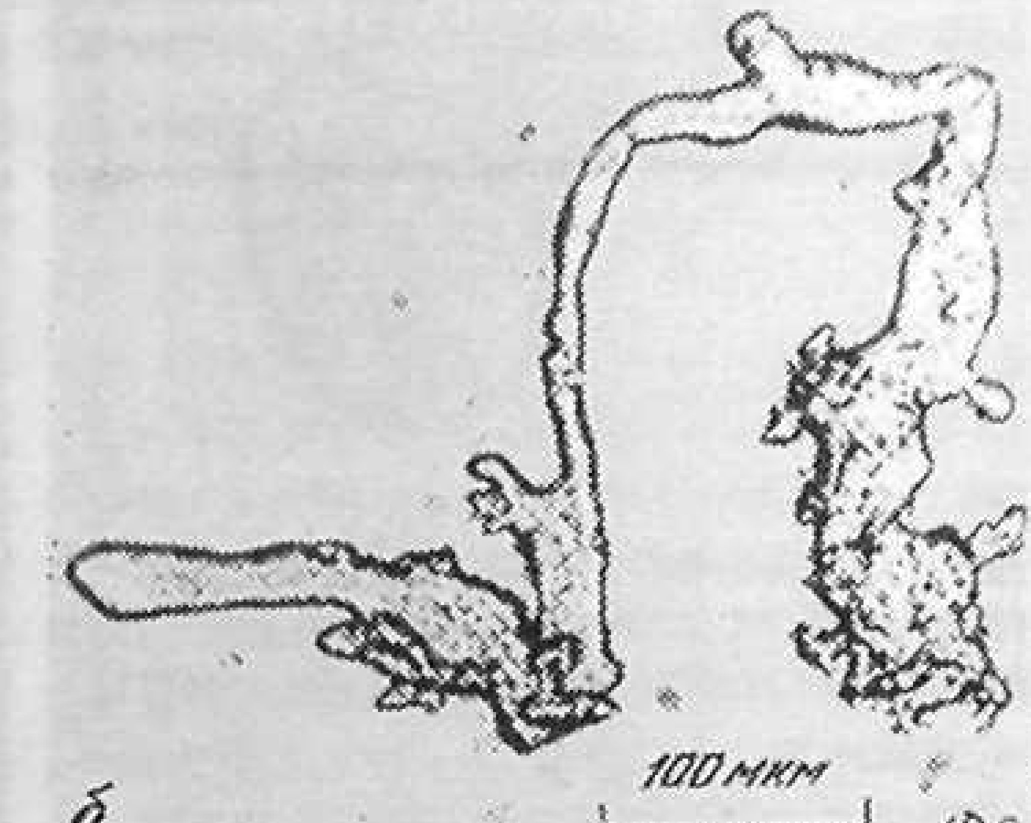


Рис. 20. Амебоидность ооплазмы яйца S. nudus при непрерывной инкубации в растворе цитохалазина D (5 мкг/мл) в течение 5 ч *(а)* и 20 ч *(б)*

быстрее, в течение нескольких секунд. Быстрая подвижность была наиболее выражена через 1–1,5 ч после обработки цитохалазинами, длилась в течение 1–2 ч и блокировалась повторным добавлением цитохалазина (в концентрации 2 мкг/мл и выше).

Итогом фазы быстрой подвижности нередко оказывалось аберрантное, быстро прекращавшееся дробление с образованием двух–четырех бластомеров внутри оболочки или фрагментация яиц, лишенных оболочки (рис. 18). Чаще же не наблюдалось даже аберрантного дробления или фрагментации, и быстрая подвижность либо прекращалась, либо переходила в другой тип подвижности – значительно более медленное движение, как бы "растекание" ооплазмы, совершавшееся в течение нескольких часов и приводившее к возникновению амебообразных форм (рис. 19). Этот тип подвижности оказался нечувствительным к цитохалазину; более того, непосредственно в растворе цитохалазина В или D (5 мкг/мл) возникали сначала каплевидные моноподиальные формы и через не-

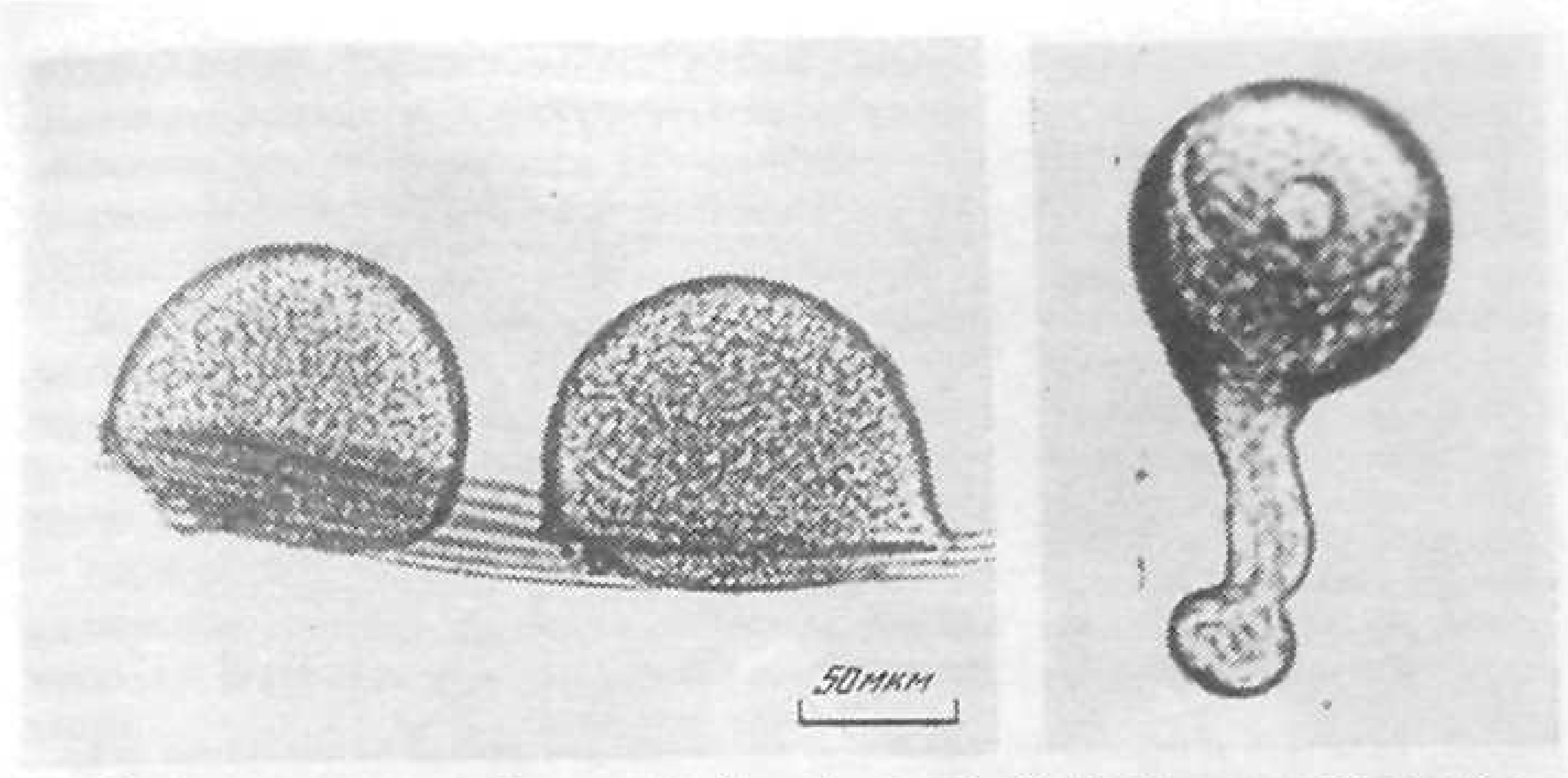


Рис. 21. Адгезивность к субстрату яиц S. nudus после обработки цитохалазином В с последующей отмывкой (Исаева, Чуриков, 1988а)

Рис. 22. Амебоидная подвижность ооцита S. nudus в растворе цитохалазина D (2 мкг/мг, 1 ч)

сколько часов – амебообразные формы с несколькими "лобоподобиями" (рис. 20); доля тех и других форм составляла 5–10% от числа обработанных яиц. После длительного пребывания в растворе цитохалазина D ооплазма каждого яйца принимала причудливую червеобразную форму (пример см. на рис. 20).

Обработанные цитохалазином (2 и 5 мкг/мл) яйца без оболочки оплодотворения отличались от интактных неоплодотворенных яиц адгезивностью – они прилипали к субстрату (рис. 21) и друг к другу, что свидетельствует об изменениях поверхности яиц и потере нормальной ригидности кортекса. На "разжижение" ооплазмы яиц, обработанных цитохалазином, указывает также удлинение и уплощение ооплазмы, что наиболее наглядно проявляется в увеличении площади амебообразных форм по сравнению со сферическими (см. рис. 19).

Ооциты морского ежа оказались более чувствительными к действию цитохалазина, чем зрелые яйца; сразу после обработки цитохалазином во всех концентрациях (начиная с 1 мкг/мл) и даже без отмывки от цитохалазина ооциты характерным образом вытягивались, приобретая каплевидную моноподиальную форму, причем ядро смещалось к "переднему" концу, располагаясь у самой поверхности (см. рис. 22), и затем иногда выталкивалось. Более длительное (2–7 ч) пребывание ооцитов в растворах цитохалазина приводило к массовому возникновению типичных форм, специфичных для каждого из двух примененных цитохалазинов. Цитохалазин В вызывал появление на поверхности ооцитов множества округлых протуберанцев, отделяющихся от основной массы ооплазмы (рис. 23,*а*). Обработка же цитохалазином D вела к "филоподиальной трансформации" ооцитов: возникновению филоподиальных отростков по всей поверхности клетки (рис. 23,*б*). Следует отметить, что использо-

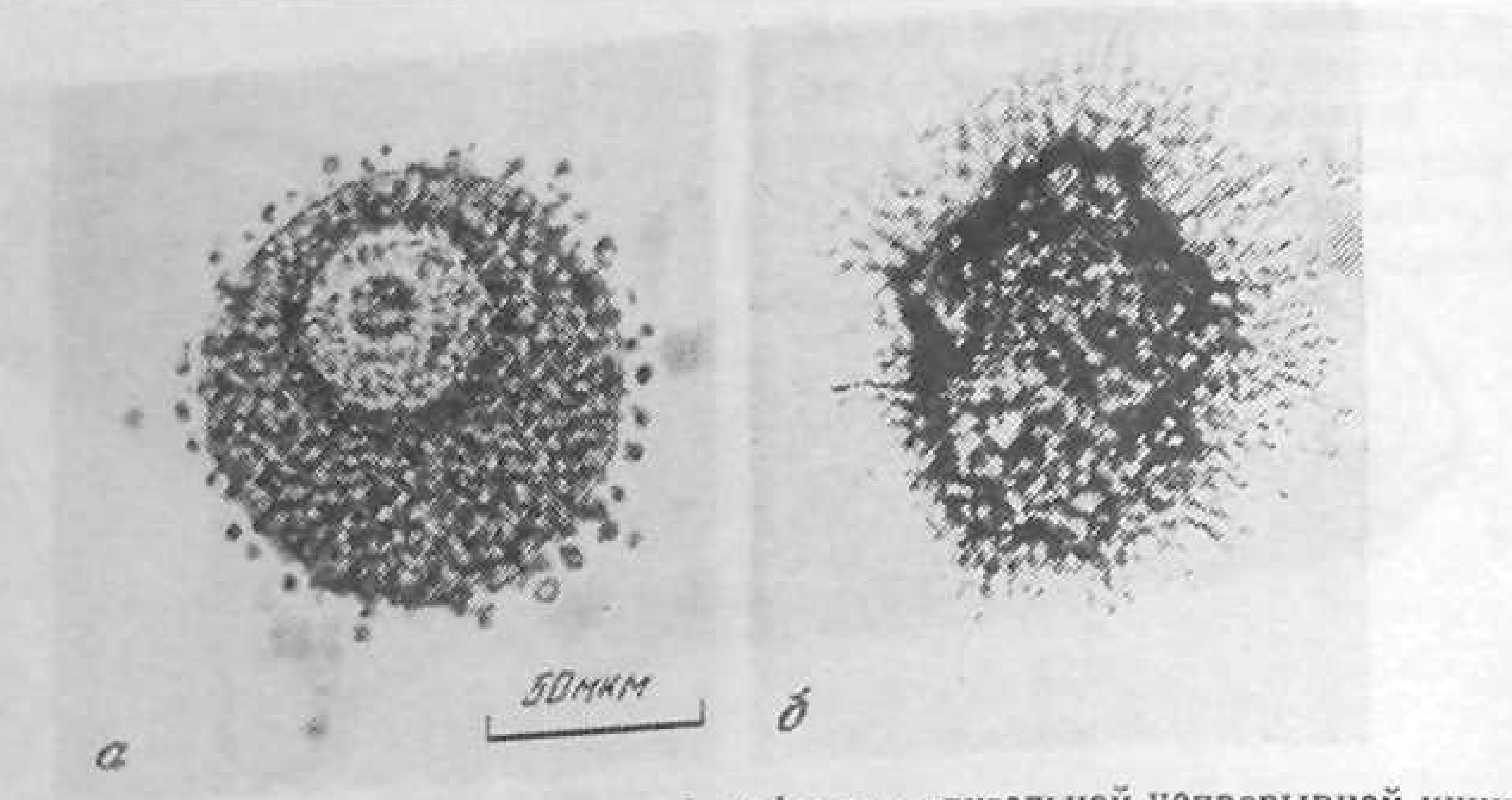


Рис. 23. Типичная морфология ооцитов S. nudus при длительной непрерывной инкубации в растворе цитохалазина

а – цитохалазин B (5 мкг/мл, 5 ч); *б* – *цитохалазин D (5 мкг/мл, 7 ч)*

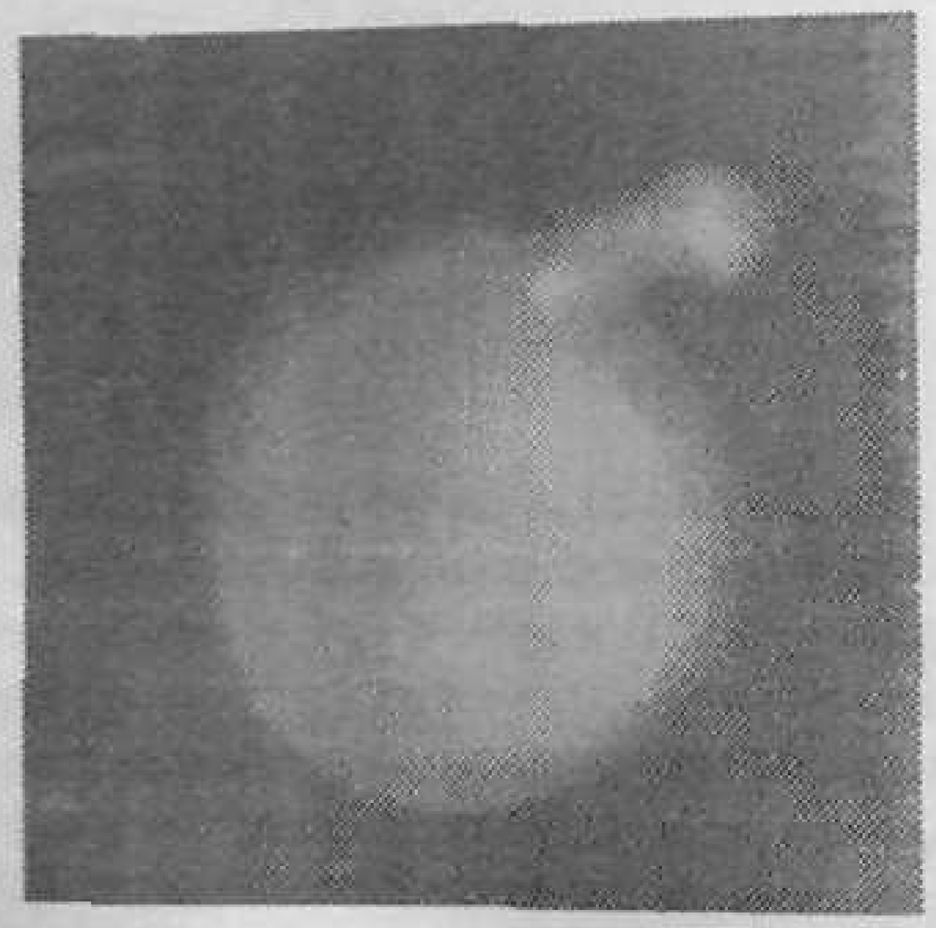


Рис. 24. Амебоидная подвижность ооплазмы яйца E. cordatum (родаминфаллоидин)

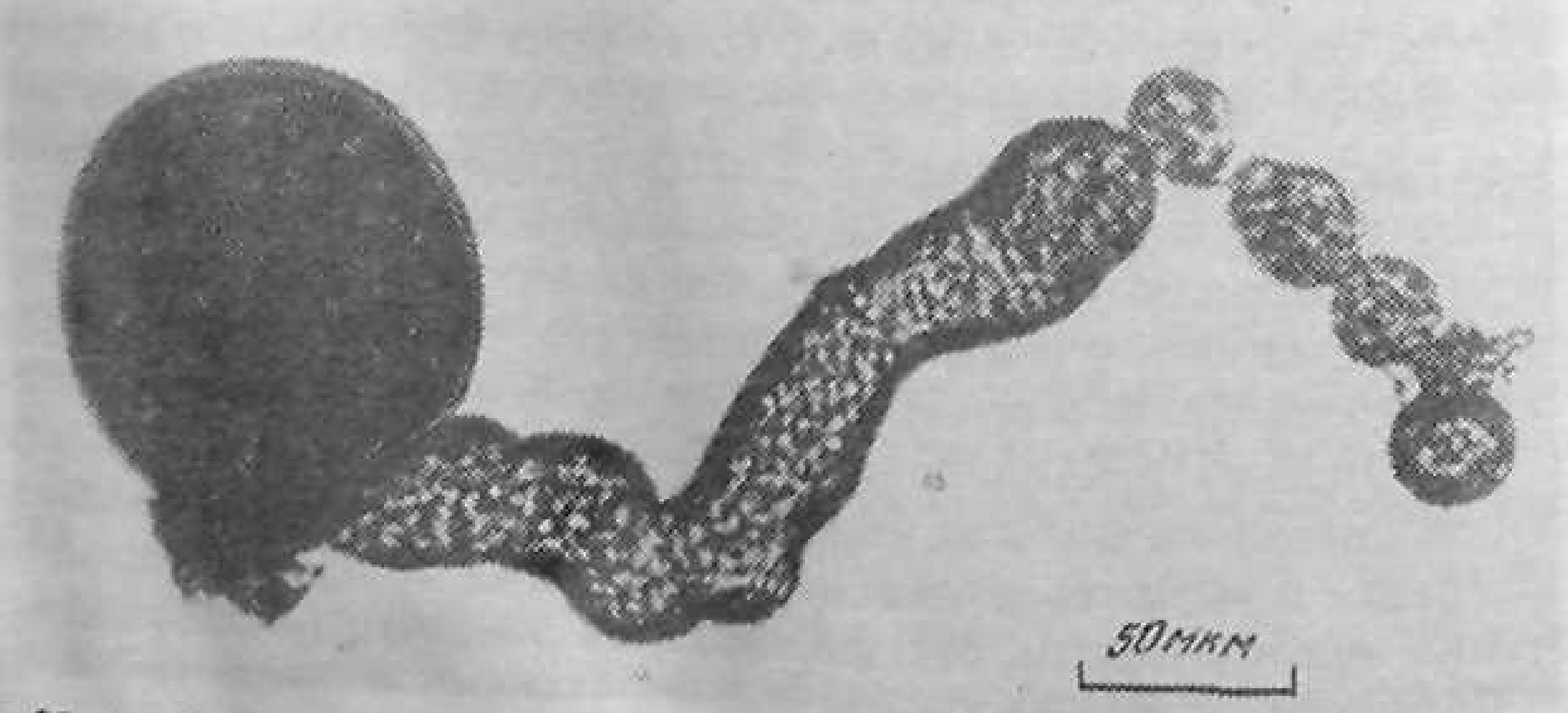


Рис. 25. Амебоидность протопласта зиготы водоросли Pelvetia wrightii после обработки цитохалазином D (5 мкг/мл, 20 ч)

ванный в этих опытах исходный раствор цитохалазина B или D при разведении до обычно применяемых концентраций (1 и 2 мкг/мл) оказывал *типичное для цитохалазина B воздействие на культивируемые клетки* (первичной мезенхимы морского ежа), вызывая быстрое втягивание, исчезновение клеточных отростков (филоподий и ламеллоподий).

Подобная амебоидная подвижность ооплазмы в результате обработки цитохалазинами B или D обнаружена у неоплодотворенных яиц Echinocardium cordatum. Применение родаминфаллоидина выявило обычную для яиц этого вида диффузную флуоресценцию ооплазмы, несколько более интенсивную в псевдоподиальном выступе ооплазмы (рис. 24).

Амебоидная подвижность ооплазмы наблюдалась иногда и у яиц бурой водоросли Pelvetia wrightii, обработанных цитохалазином (рис. 25); о влиянии цитохалазина на полярность зародышей этой водоросли см. ниже.

Таким образом, цитохалазин, хорошо известный и широко применяемый игибитор различных проявлений клеточной и субклеточной подвижности, зависящей от структурной организации актиновых филаментов, может проявлять парадоксальный на первый взгляд эффект, индуцируя как сократимость кортикального слоя и активацию яиц, так и амебоидную подвижность яиц и абортивное дробление. Механизм действия цитохалазинов обусловлен, насколько известно, подавлением полимеризации актина путем значительного снижения ее скорости на быстрорастущем конце актиновых филаментов (Bonder et al., 1986; Cooper, 1987; Suzuki, Mihashi, 1991); кроме того, цитохалазин, по-видимому, прямо или косвенно способствует разрывам актиновых филаментов (Bonder, Mooseker, 1986; Brett, Godman, 1986).

Показано, что обработка цитохалазином нарушает нормальную организацию кортикального цитоскелета яиц морского ежа (Banzhaf et al., 1980; *Schatten, Schatten, 1981), ведет к уменьшению числа микрофиламентов и их* укорочению в кортексе неоплодотворенных яиц, что выявлено окрашиванием родаминилфаллоидином (Cline et al., 1983). О нарушении нормальной организации кортекса неоплодотворенных яиц морского ежа цитохалазином свидетельствует и аберрантная морфология кортикального слоя обработанных яиц (Schatten, Schatten, 1981). В неоплодотворенных яйцах морского ежа найдены все основные молекулярные компоненты актомиозиновой сократительной системы, отсутствие же проявлений подвижности до оплодотворения обусловлено образованием комплексов актина с актинсвязывающими белками (Kane, 1980, 1983; Hosoya, Mabuchi, 1984; Mabuchi et al., 1985). Кейн показал на экстрактах яиц морского ежа наличие двух возможных состояний геля – ригидного структурного или же сократимого и их взаимопревращение в зависимости от соотношения *молекулярных компонентов (Kane, 1980, 1983).*

Разрушение цитохалазином ригидной сети кортикального актинового цитоскелета допускает аберрантные проявления подвижности ооплазмы, не совместимые с нормальным развитием, а также контактные реакции клетка–клетка и клетка–субстрат, характерные для подвижных соматических клеток и в норме полностью отсутствующие у яиц. Вероятно, в

результате разрушения сети фибриллярного актина возникают свободные концы актиновых филаментов; становится возможной реализация актомиозинового взаимодействия в форме сокращения кортикальной цитоскелетной сети.

Кортикальная реакция яиц морского ежа, по данным Шеттена (Schatten, 1982, 1984), протекает и в присутствии цитохалазина, не подавляясь им. Найдена также нечувствительность к цитохалазину процесса сокращения поверхностного слоя анимального полушария яиц Xenopus (Christensen, Merriam, 1982). Вообще дифференциальная реакция клеток разных типов на действие цитохалазина, по-видимому, зависит от особенностей организации их цитоскелета (Brett, Godman, 1986; Kumagai et al., 1986; Bailly et al., 1991). Однако у неоплодотворенных яиц морского ежа цитохалазин не только не подавляет кортикальное сокращение, но и индуцирует его. Подобным образом высокое гидростатическое давление индуцирует сокращение кортекса яиц морского ежа (Begg et al., 1983). В том и другом случае, как мы полагаем, именно частичное разрушение ригидного цитоскелетного комплекса с разрывами актиновых филаментов обеспечивает возможность функционирования актомиозинового комплекса как сократительной системы. Поэтому нечувствительность кортикального сокращения к действию цитохалазина у яиц Xenopus, как нам кажется, не дает достаточных оснований для предположения о независимости этого процесса от актиновых филаментов (Christensen, Merriam, 1982). С другой стороны, описан эффект стимуляции цитохалазином процесса экзоцитоза у клеток желудка крыс (Piyachaturawat et al., 1986), который можно считать сходным с индукцией кортикальной реакции, т.е. экзоцитоза кортикальных гранул воздействием цитохалазина на неоплодотворенные яйца морского ежа.

Как активация, так и амебоидная подвижность яиц морского ежа и яиц или ооцитов некоторых других животных могут быть вызваны самыми разнообразными физическими и химическими факторами, общность механизма воздействия которых заключается лишь в повреждении кортекса яиц (Вильсон, 1936; Just, 1939; Harvey, 1956; Rebhun, 1975; Carroll, Eckberg, 1986). Нормальное развитие после искусственной активации яиц наблюдается относительно редко, в большинстве случаев дробление аберрантно и быстро блокируется, иногда активация проявляется лишь в отделении оболочки оплодотворения без последующего дробления. В обширных и частично совпадающих списках агентов, активирующих яйца и индуцирующих их амебоидность, цитохалазин отсутствует. Амебоидная подвижность яиц морского ежа была индуцирована также высоким гидростатическим давлением (Marsland, 1939), которое разрушает нормальную организацию кортикального цитоскелета, вызывает сокращение кортекса и амебоидную подвижность яиц (Begg et al., 1983).

"Быстрая" амебоидная подвижность яиц морского ежа сходна с описанной другими авторами амебоидностью яиц различных животных. Практически все описанные Ребуном (Rebhun, 1975) у ооцитов Spisula типы амебоидной подвижности наблюдали и мы как варианты "быстрой" подвижности; такого рода амебоидность может быть вызвана самыми

разнообразными воздействиями. Другой ингибитор опосредованных микрофиламентами процессов, латрункулин, вызывает "псевдодробление" осемененных яиц мыши (Schatten et al., 1986), по существу амебоидную подвижность их. Описано псевдодробление ооцитов мыши (разделение на ядерный и безъядерный фрагменты) при воздействии цитохалазина (Wassarman et al., 1977). Быстрый тип амебоидной подвижности яиц морского ежа часто ведет к аберрантному дроблению или фрагментации. Как и цитотомия, быстрая амебоидная подвижность блокируется цитохалазином, что показано на ооцитах Spisula (Rebhun, 1975; Carroll, Eckberg, 1986) и нами на яйцах морского ежа. Вероятно, амебоидная подвижность, как и цитотомия, зависит от функционирования актиновых филаментов. Однако неорганизованная амебоидная подвижность яиц, как правило, не совместима с нормальным развитием, отличаясь тем самым от регулируемого локализованного сокращения кортекса при ооплазматической сегрегации и делениях дробления.

Помимо кортикального сокращения и последующей амебоидной подвижности у обработанных цитохалазином яиц найден еще один тип подвижности – медленной, нечувствительной к действию цитохалазина. Этот последний тип подвижности сравним с наблюдаемым у фибробластов и фибробластоподобных клеток in vitro распластыванием и арборизацией в присутствии цитохалазина (Croop, Holtzer, 1975; Блиох и др., Menko et al., 1983; Brett, Goldman, 1986). Как и арборизация фибробластов, медленная подвижность яиц морского ежа, вероятно, не зависит от функционирования актиновых филаментов. Поскольку в яйце морского ежа промежуточные филаменты, играющие ведущую роль в арборизации фибробластов (Menko et al., 1983), не выявлены, медленное "растекание" ооплазмы, возможно, зависит от аберрантного функционирования системы микротрубочек.

Большая чувствительность ооцитов к воздействию цитохалазина по сравнению со зрелыми яйцами, вероятно, обусловлена недоразвитием ригидного кортикального цитоскелета. Необычные черты морфологии поверхности ооцитов, обработанных цитохалазином B или D, свидетельствуют как о специфике эффекта каждого из двух примененных цитохалазинов, так и об особенностях морфофункциональной организации кортикального цитоскелета ооцитов сравнительно со зрелыми яйцами – подобно тому, как особенности реакции на цитохалазин поверхности борозды дробления яйца морского ежа (Usui, Yoneda, 1989) свидетельствуют об отличиях этой поверхности от остального кортекса яйца (см. гл. II). Поляризованное по анимально-вегетативной оси ооцита морской звезды сокращение со смещением ядра к самой поверхности анимального полюса при действии ионофора A 23187 описано Шредером (Schroeder, 1985); оно сходно как со смещением ядра обработанных цитохалазином ооцитов в наших опытах, так и с псевдодроблением ооцитов мыши (разделением их на ядерный и безъядерный фрагменты) в растворе цитохалазина (Wassarman et al., 1977). В последних двух случаях проявляется уже рассмотренный выше парадоксальный эффект цитохалазина как агента, индуцирующего сократительную активность кортекса.

НАРУШЕНИЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ ЗИГОТ БУРОЙ ВОДОРОСЛИ PELVETIA WRIGHTII: ЭФФЕКТ ЦИТОХАЛАЗИНА

Уникальная возможность экспериментального воздействия на первичную полярность яйца и зародыша в период ее детерминации появляется при использовании зигот фукоидных бурых водорослей (роды Fucus и Pelvetia). Поляризация яйца или споры растений обусловлена возникновением и стабилизацией апикально-базальных осевых различий, транслируемых в ходе развития в основную ось дефинитивной формы, что полностью сопоставимо с поляризацией яиц животных (Brawley, Robinson, 1985; Quatrano et al., 1985; Turian, 1985). Однако в отличие от яиц животных у бурых водорослей семейства фукусовых яйцо и зигота вскоре после слияния гамет аполярны, обладая сферической симметрией. Положение апикально-базальной оси детерминируется в течение нескольких часов после оплодотворения в зависимости от градиента освещенности или иных градиентов окружающей среды (обзоры: Quatrano, 1974, 1978; Bentrup, 1984; Waaland, 1984). Ориентация оси поляризующейся зиготы сначала лабильна, затем полярность зиготы становится фиксированной, практически необратимой. Поэтому зиготы фукусовых представляют собой незаменимую модель для исследования механизмов поляризации яйцевой клетки. Одно из самых ранних проявлений поляризации зиготы фукусовых – генерация электрического поля с паттерном силовых линий, предваряющим будущую морфологическую полярность зародыша (Nuccitelli, 1978, 1983, 1984). Вслед за тем осуществляются сегрегация клеточных органоидов, синтез, векторизованный транспорт и локализованная на полюсе будущего ризоида секреция сульфатированного полисахарида, фукоидина (Quatrano, 1972, 1974; Brawley, Quatrano, 1979; Quatrano et al., 1985). Примерно через 20 ч после оплодотворения поляризованная зигота делится на две качественно различные клетки с разной судьбой в развитии: клетку ризоида (с начавшим отрастать еще до первого деления зачатком ризоида) и клетку будущего таллома.

Цитохалазины полностью (но обратимо) подавляют и морфологическую экспрессию поляризации зиготы (Nelson, Jaffe, 1973; Quatrano, 1973), и такие проявления полярности, как генерация электрического тока (Brawley, Robinson, 1985), направленный транспорт фукоидина (Brawley, Quatrano, 1979; Quatrano et al., 1985). Результаты этих исследований действия цитохалазина на зиготы Fucus districhus и Pelvetia fastigiata свидетельствуют о существенной роли фибриллярного актина в становлении полярности зигот фукусовых водорослей.

В данной работе воздействие цитохалазином В (Исаева, 1990б) или D на зиготы Pelvetia wrightii использовано не для полного подавления поляризации зигот, но с целью нарушения ее нормального униполярного паттерна, индукции развития зародышей с двумя и более ризоидами, т.е. биполярных и мультиполярных форм. Необходимо отметить, что в контрольных опытах при развитии зародышей в морской воде не обнаружено ни одного случая возникновения биполярных или мультиполяр-

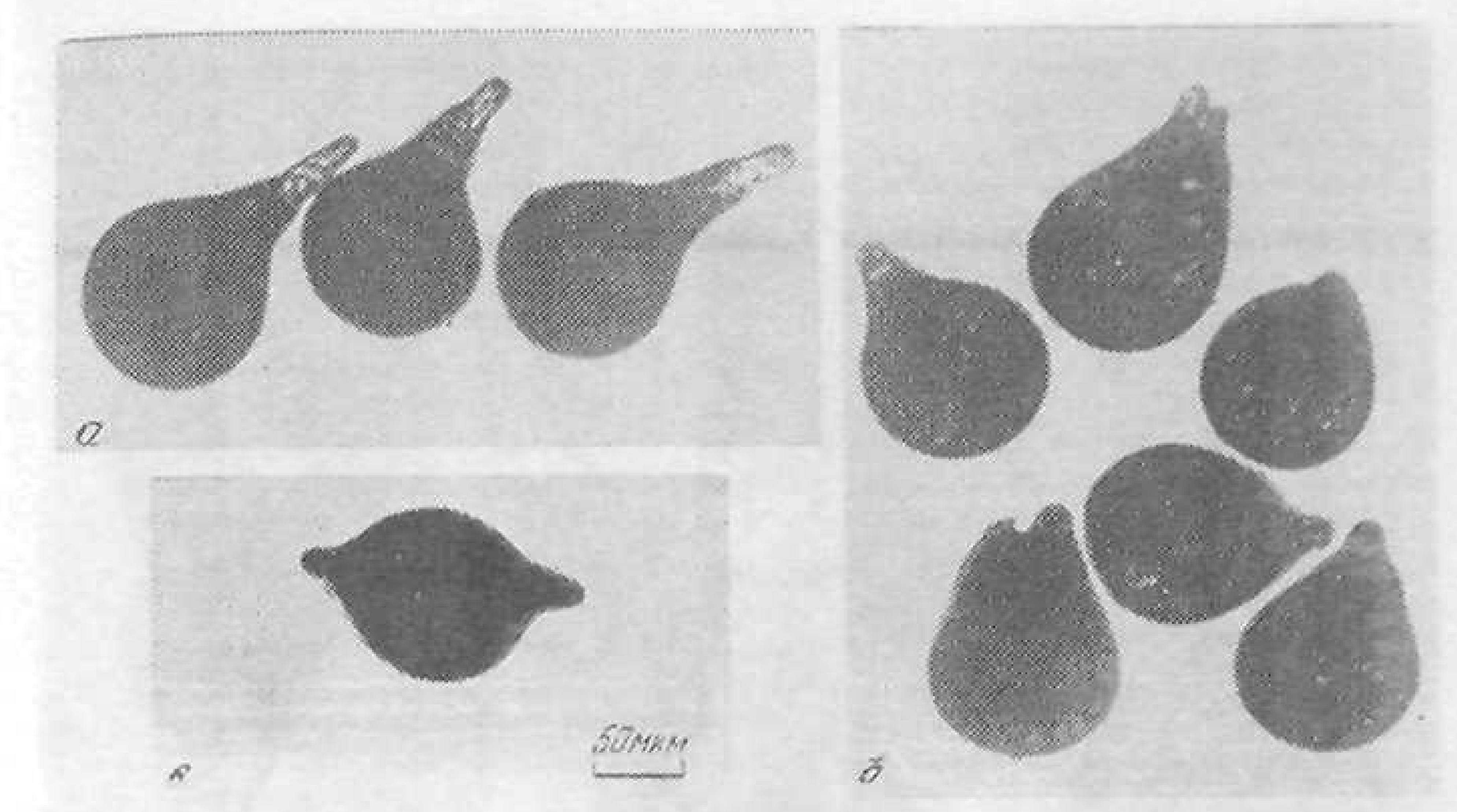


Рис. 26. Зародыши водоросли Pelvetia wrightii
а – контроль; *б*, *в* – после обработки цитохалазином В

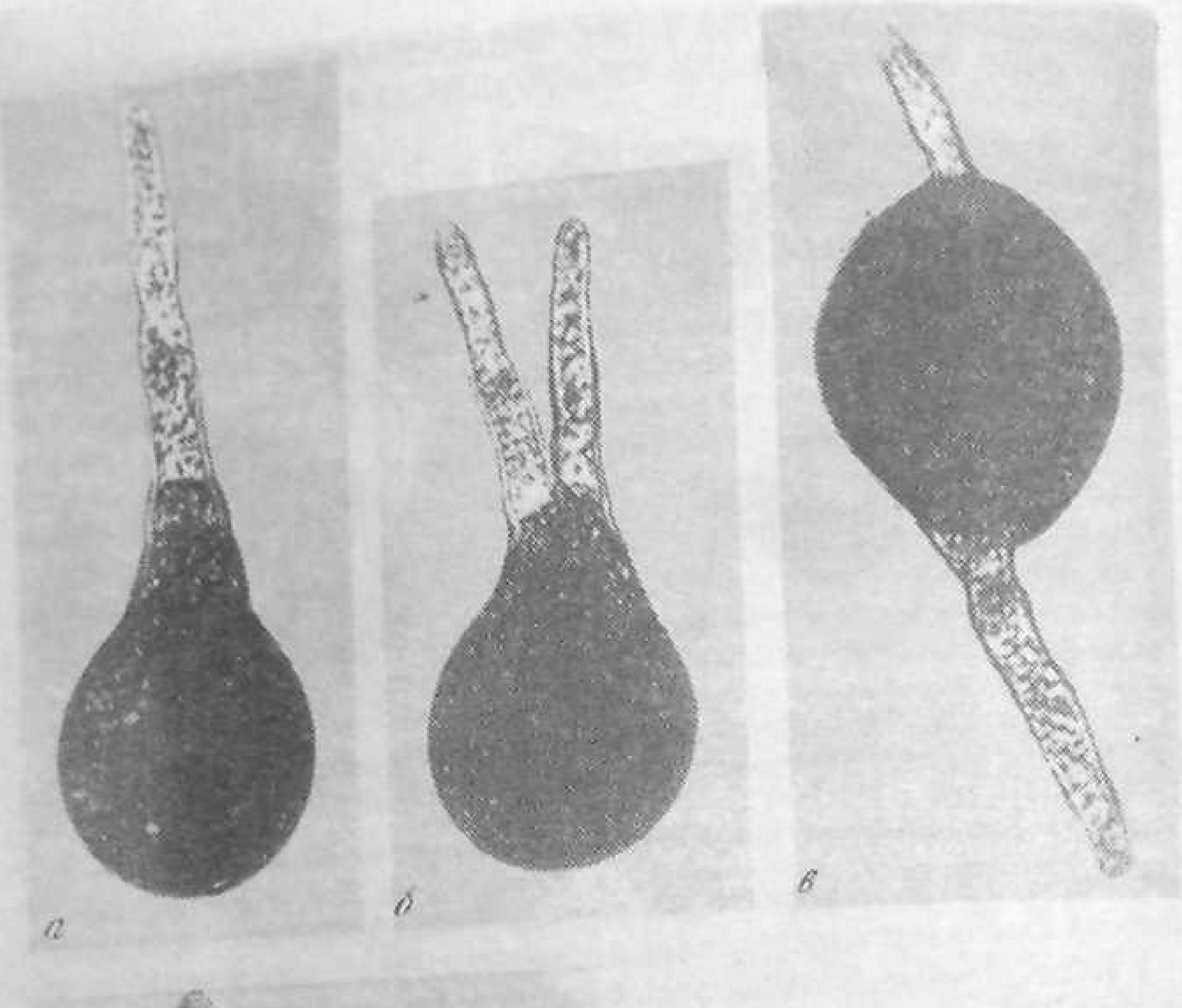
ных форм, т.е. зародышей с ризодами, локализованными на противоположных или значительно отстоящих друг от друга полюсах зиготы.

У зигот, обрабатываемых раствором цитохалазина В или D (5 мкг/мл) в течение 20 ч, к концу периода обработки, еще до отмывки от цитохалазина, часто начиналось отрастание ризоида, у многих зигот происходило и первое деление дробления, хотя оба события обычно оказывались несколько задержанными по сравнению с контролем.

Биполярные зародыши изредка (менее 1% зигот) были заметны уже через 24–30 ч после начала опыта (т.е. вскоре после удаления цитохалазина) на двуклеточной стадии развития. В этих случаях отрастание ризоида начиналось одновременно на двух противоположных полюсах зиготы, в отличие от нормального униполярного образования ризоида (рис. 26,*а*,*в*). В результате первого деления биполярной зиготы возникал зародыш, состоящий из двух зеркально симметричных ризоидных клеток, тогда как в норме двуклеточный зародыш образован морфологически и функционально различными клетками будущего таллома и будущего ризоида. На этой же стадии развития у обработанных цитохалазином зародышей заметно значительно более частое по сравнению с контролем появление двух ризоидов на одном и том же полюсе (рис. 26,*б*).

Нередко дополнительные ризоиды появлялись позже первого, так что доля биполярных и мультиполярных зародышей возрастала по мере их развития, достигая 21,4% у 10-суточных зародышей (см.: Исаева, 1990б).

На рис. 27 представлены основные формы зародышей, развивающихся после обработки цитохалазином В или D: типичная униполярная форма (*а*); униполярная с двумя ризоидами (*б*); биполярная форма с ризоидами, локализованными на противоположных полюсах зародыша (*в*);



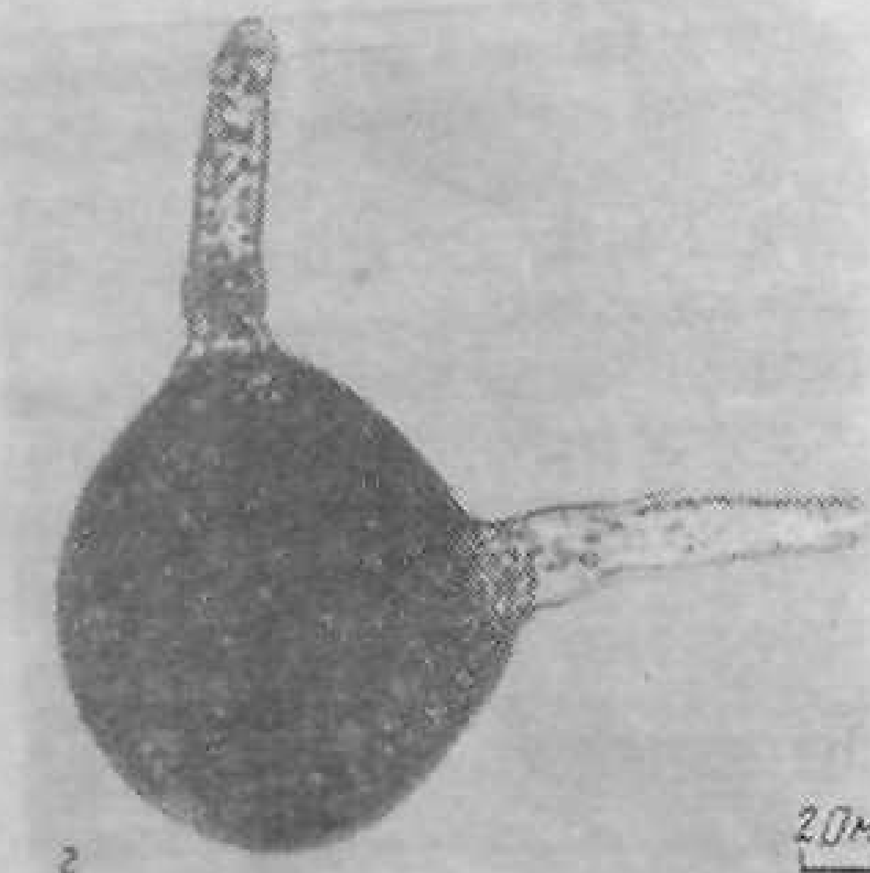


Рис. 27. Паттерны поляризации зародышей P. wrightii после воздействия цитохалазином (4 сут)

а — униполярная форма в одним ризоидом; *б* — униполярная форма с двумя ризоидами; *в, г* — варианты биполярных форм

биполярный зародыш с ризоидами, локализованными под углом, близким к 90° (*г*).

Среди контрольных зародышей при постоянстве униполярного паттерна помимо типичных форм с единственным прямым неветвящимся ризоидом были весьма обычны формы с многолопастным расчлененным, а позже разветвленным ризоидом, встречались и зародыши с двумя ризоидами на одном и том же полюсе.

В результате обработки цитохалазином В доля таких атипичных

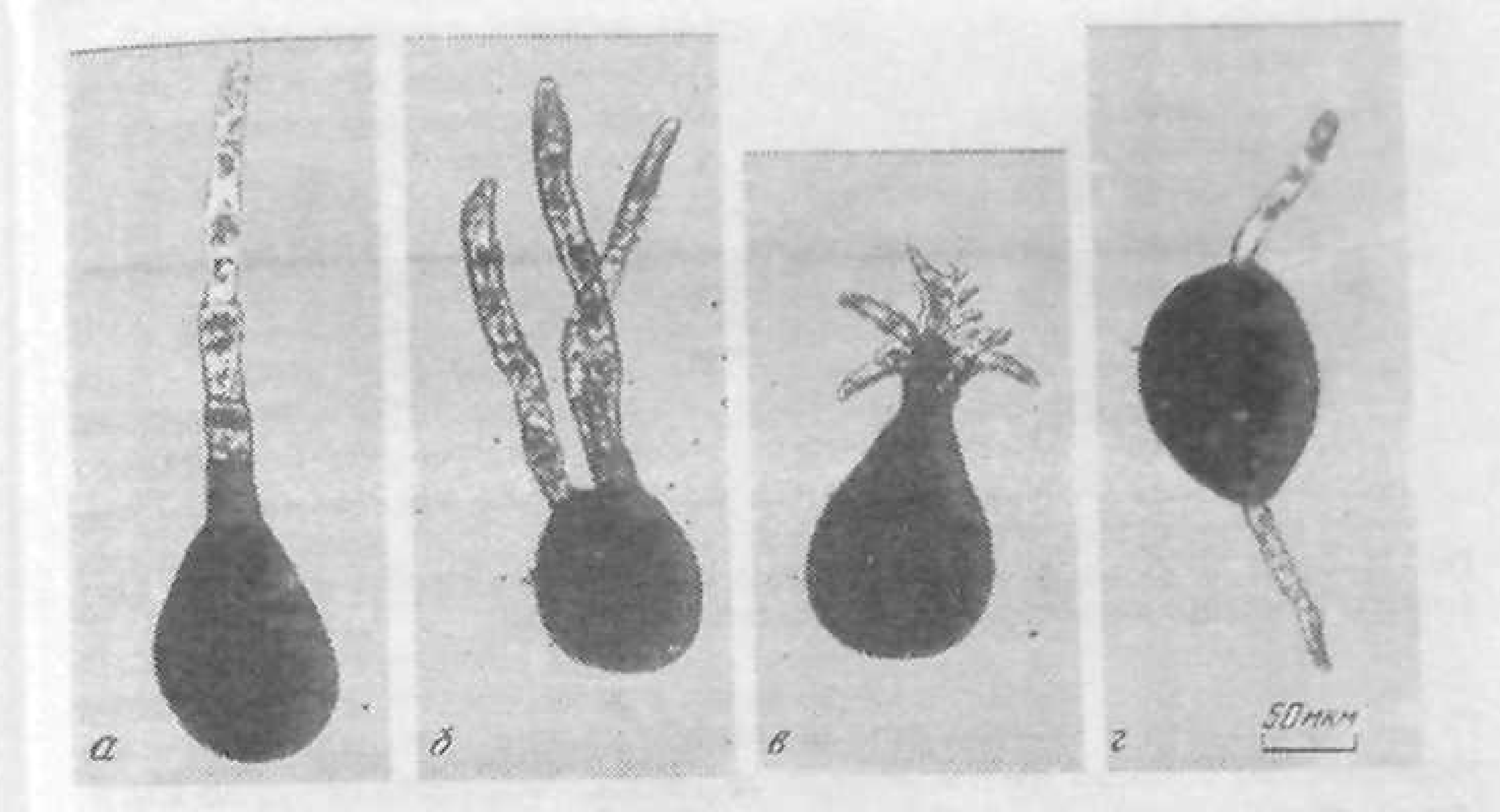


Рис. 28. Зародыши P. wrightii после обработки цитохалазином (6 сут)

а — униполярная форма с одним ризоидом; *б* — униполярный зародыш с тремя ризоидами; *в* — униполярный зародыш с ветвящимся ризоидом; *г* — биполярный зародыш

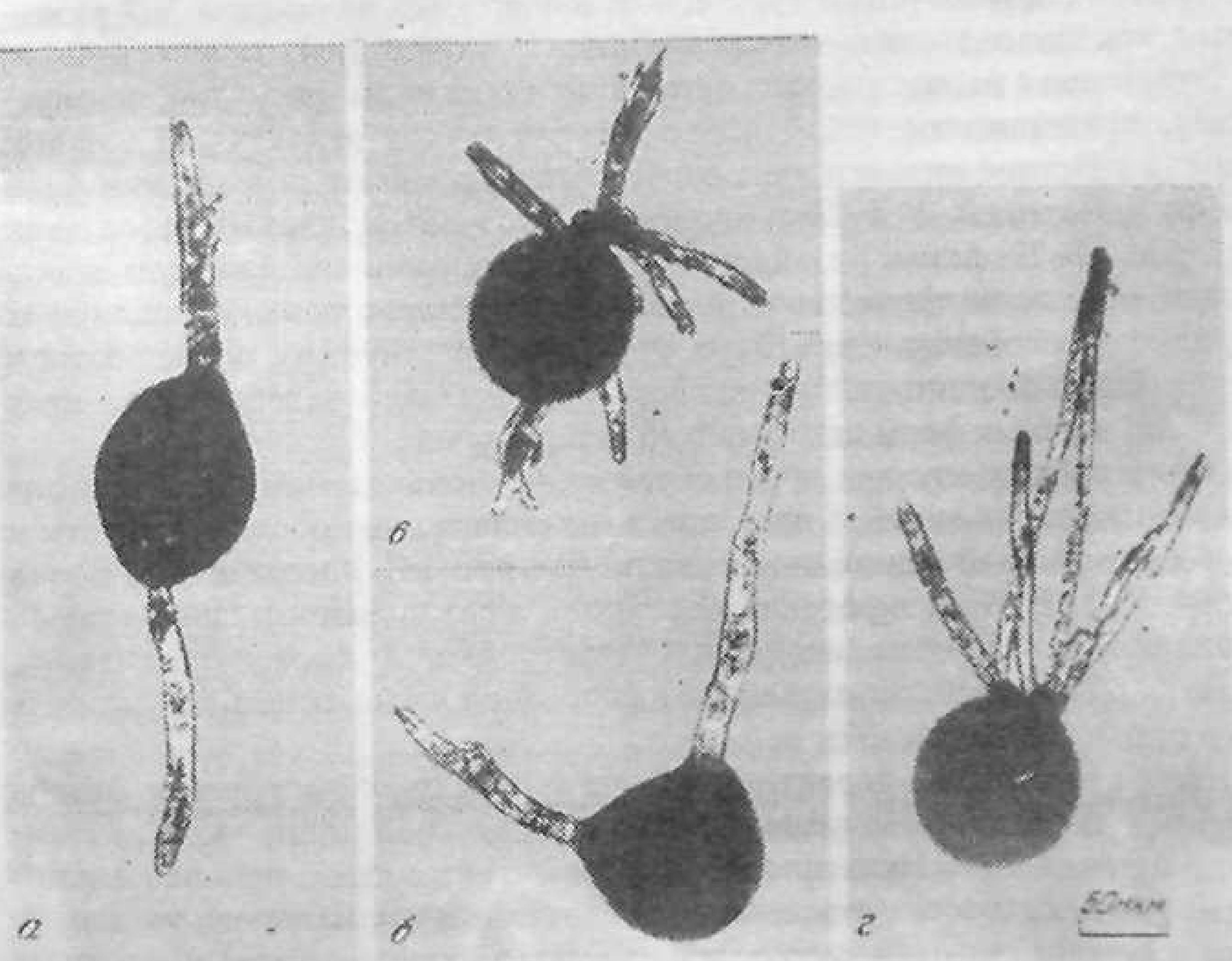


Рис. 29. Нарушения поляризации зародышей P. wrightii, вызванные воздействием цитохалазина (10 сут)

а, б — биполярные формы; *в* — мультиполярный зародыш; *г* — униполярный зародыш с несколькими ризоидами

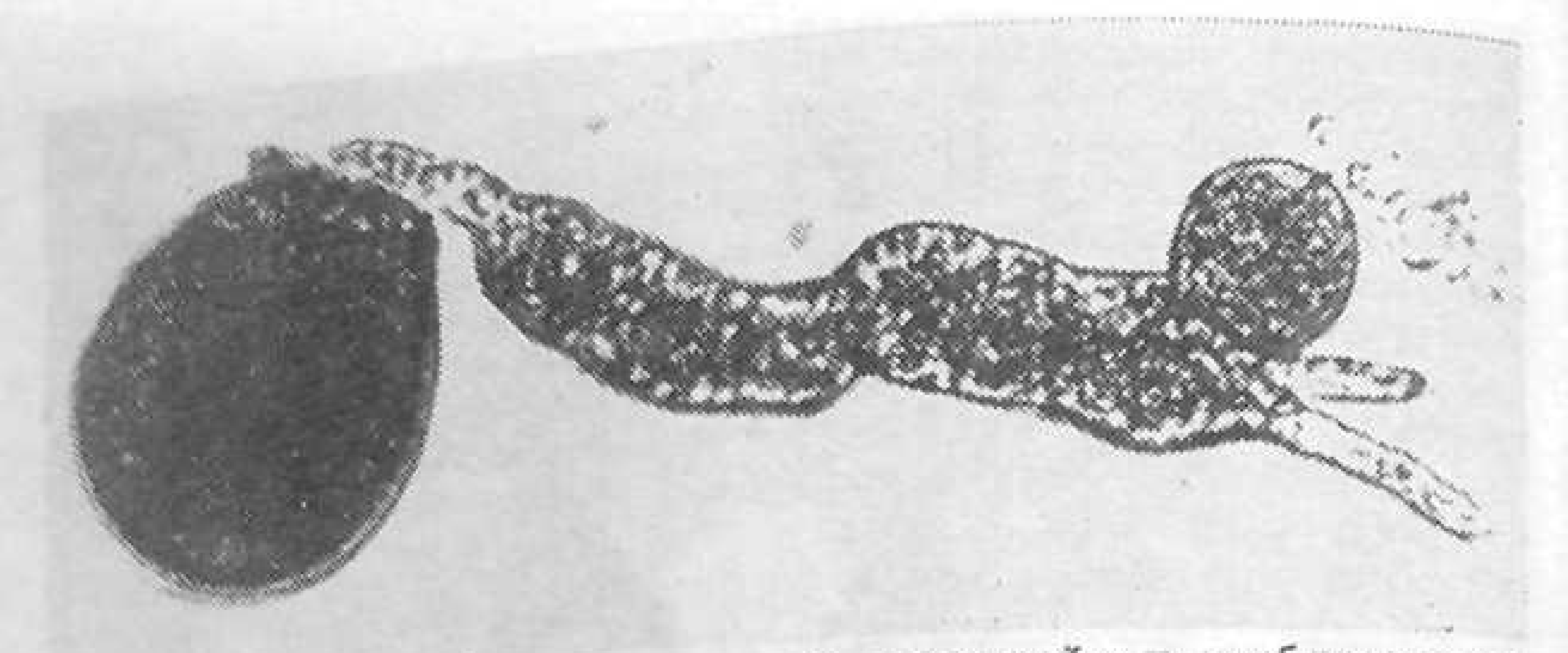


Рис. 30. Биполярный зародыш с тремя ризоидами, развившийся из амебоидного протопласта P. wrightii после обработки цитохалазином (6 сут)

униполярных форм существенно возрастала, тогда как доля типичных униполярных зародышей в ходе развития снижалась через 10 сут до 15,7% (см.: Исаева, 1990б); количественные различия не дают исчерпывающего описания эффекта цитохалазина на паттерн поляризации зигот P. wrightii, поскольку биполярные и мультиполярные формы (см. рис. 27,*в,г*; 28,*г*; 29,*а–в*) полностью отсутствуют в контроле. Кроме того, после обработки цитохалазином среди униполярных форм нередки зародыши не только с двумя (что встречается и в контроле), но также с 3–7 ризоидами, локализованными на одном полюсе (рис. 28,*б*, 29*г*).

Зародыши с лапчатым, рано ветвящимся ризоидом (рис. 28,*в*), по-видимому, представляют собой вариант нормального развития P. wrightii, однако действие цитохалазина ведет к значительному возрастанию доли таких зародышей. У 4–10-суточных би- и мультиполярных зародышей (см. рис. 27–29) длина ризоидов, как правило, различна и притом значительно меньше по сравнению с длиной ризоида нормальных униполярных зародышей, особенно через 10 сут. Это свидетельствует и о более позднем появлении дополнительных ризоидов, и об общей задержке развития мультиполярных форм относительно униполярных.

В нескольких случаях после обработки цитохалазином стенка зиготы оказалась разрушенной, а протопласт – лежащим вне оболочки зиготы и способным к амебоидной подвижности (см. рис. 25). Впоследствии форма протопласта стабилизировалась (вероятно, в результате отделения новой оболочки) и зародыш необычной червеобразной формы развивался, образуя ризоиды, локализованные на противоположных концах удлиненного протопласта (рис. 30).

Итак, воздействие цитохалазином на зиготы бурой водоросли Pelvetia wrightii в период становления апикально-базальной полярности вызывало появление би- и мультиполярных форм с ризоидами, локализованными на разных полюсах зародыша, т.е. нарушения нормального униполярного паттерна зигот и зародышей, а также существенное возрастание сравнительно с контролем доли униполярных форм с многолопастным, ветвящимся ризоидом и доли форм с двумя и большим числом ризоидов, расположенных рядом на одном и том же полюсе зародыша.

Для эффективного полного (хотя и обратимого) подавления поляризации зигот фукусовых водорослей требуется действие цитохалазина высокой концентрации: 50–100 мкг/мл (Nelson, Jaffe, 1973; Quatrano, 1973; Brawley, Robinson, 1985). Нарушения поляризации зигот Pelvetia wrightii были вызваны применением цитохалазина относительно низкой концентрации (5 мкг/мл), близкой к используемым для обработки клеток животных, однако воздействие длилось в течение 20 ч, причем лишь замедляя, но не подавляя полностью отрастание ризоида и деление зиготы. Для экспериментального нарушения процессов поляризации у грибов: в гаметангиях Allomyces (Turian, Ojha, 1987) и при прорастании спор Uromyces (Tucker et al., 1986) – также потребовалось длительное действие высоких концентраций цитохалазина, что необходимо и для подавления тока цитоплазмы в соматических клетках зеленой водоросли Chara (Nothnagel et al., 1981). По-видимому, клетки водорослей и грибов значительно менее чувствительны к действию этого ингибитора по сравнению с клетками животных, по крайней мере соматическими.

В контрольных опытах при развитии зигот P. wrightii в растворе диметилсульфоксида той же концентрации, что и вносимая при обработке цитохалазином, не найдено нарушений нормальной униполярной организации зародышей. По данным исследований на F. distichus и P. fastigiata диметилсульфоксид, примененный в несколько более высоких концентрациях, но при менее длительном воздействии, не влиял ни на поляризацию зигот, ни на динамику процесса (Nelson, Jaffe, 1973; Quatrano, 1973). Поскольку возможен антимикротрубочковый эффект диметилсульфоксида при использовании его в значительно более высокой концентрации (Turian, Ojha, 1987) сравнительно с примененной в опытах на P. wrightii, уместно отметить, что Кватрано не обнаружил подавления поляризации зигот у F. distichus при действии классического антимикротрубочкового агента – колхицина (Quatrano, 1973).

Нарушения поляризации зигот P. wrightii, по всей вероятности, обусловлены эффектом цитохалазина – разрушением организации системы актиновых филаментов (см. выше). Система актиновых филаментов – необходимый компонент цитоскелета растительных клеток: грибов (Tucker et al., 1986), зеленых водорослей (Nothnagel et al., 1981; Sheetz et al., 1984; Menzel, 1986), сосудистых растений (Parthasarathy et al., 1985; Lloyd, 1988). При поляризации зиготы фукусовых фибриллярный актин, выявляемый применением родаминфаллоидина, концентрируется у полюса ризоида, и это поляризованное распределение актина нарушается при воздействии цитохалазином (Brawley, Robinson, 1985). Экспериментальные исследования поляризации зигот фукуса и пельвеции привели к заключению о существенной (если не ключевой) роли фибриллярного актина в поляризации зиготы (Quatrano, 1978; Waaland, 1984; Brawley, Robinson, 1985).

Поскольку процесс поляризации зиготы вовлекает каскад различных событий, экспериментальные влияния на другие звенья этой цепи также могут вызвать нарушения униполярного паттерна. Появление биполярных, иногда и триполярных зародышей отмечено после воздействия на

зиготы фукусовых гипотонической средой (Küster, 1906), освещением противоположно направленными пучками поляризованного света (Jaffe, 1956); изредка дополнительные ризоиды возникали у полиспермных зигот (Brawley, 1987).

Усиление ветвления ризоидов после обработки цитохалазином, вероятно, обусловлено нарушением нормальной организации сети актиновых филаментов, наиболее плотной на вершине растущего ризоида (Brawley, Robinson, 1985) и, вероятно, выполняющей существенные морфогенетические функции и при удлинении ризоида. Сходным образом обработка цитохалазином вызвала появление многолопастных, разветвленных структур при прорастании спор Uromyces (Tucker et al., 1986).

Таким образом, литературные и наши экспериментальные данные свидетельствуют о морфогенетической функции кортикального актинового цитоскелета в детерминации проморфологии яйца и зародыша. Поляризация распределения фибриллярного актина, вероятно, играет ключевую роль в установлении и поддержании морфофункциональной анизотропии яйцевой клетки, ее осевого паттерна, детерминирующего и осевую анизотропию эмбриогенеза.

ЦИТОСКЕЛЕТ ЯЙЦА КАК ГЛОБАЛЬНЫЙ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЙ ДЕТЕРМИНАНТ ПРОМОРФОЛОГИИ

Для понимания структурных основ стабильности ооплазматической локализации, ригидности кортекса и совместимости ее со столь ярким проявлением подвижности, как образование борозд дробления, необходимо сопоставление данных об организации кортикального слоя и всей клеточной поверхности половых и соматических клеток. Исследования на соматических клетках выявляют морфофункциональное единство плазматической мембраны и кортикального цитоскелета, "заякоривание" рецепторов клеточной поверхности актиновыми филаментами (с включением промежуточных молекулярных звеньев) и трансмембранное связывание внеклеточных лигандных молекул с цитоскелетом через интегральные белки плазматической мембраны. Важнейшую роль в кортикальном цитоскелете играет актин, обеспечивающий в комплексе с другими белками как поддержание клеточной формы (собственно цитоскелетную функцию), так и многообразные проявления клеточной и субклеточной подвижности. Морфологические черты наружной поверхности с микроворсинками у зиготы морского ежа стабильны в ходе раннего дробления и отличают внешнюю поверхность ("старый" кортекс) от вновь образованных внутренних, обращенных в бластоцель или друг к другу поверхностей бластомеров (Wolpert, Mercer, 1963; Czihak, 1975). Поверхность яиц других животных также характеризуется микроворсинками либо сходными поверхностными образованиями (Speksnijder et al., 1989, см. также ссылки в начале главы).

Организация кортекса с микроворсинками по всей поверхности наблюдается у разнообразных клеточных типов при митотическом делении и

связана с активным переходом к сферической форме; подобная же организация кортикального цитоскелета с параллельными пучками актиновых филаментов в микроворсинках и кортикальным терминальным сплетением филаментов характерна для апикальной поверхности многих эпителиальных клеток. Такого рода ригидные кортикальные структуры с гелеподобной сетью актиновых филаментов, по-видимому, обеспечивают пространственную неоднородность распределения субклеточных компонентов цитоплазмы, мембранных рецепторов, фиксацию и поддержание клеточной формы, т.е. пространственную память клетки.

Вероятно, локализованный в кортикальном слое яйца и зиготы комплекс актина с актинсвязывающими белками выполняет важную морфогенетическую функцию, механохимически фиксируя неоднородно распределенные в ооплазме органоиды и макромолекулы, в том числе и вероятные носители морфогенетической информации, прежде всего информационные РНК (см. приведенные выше ссылки, а также: Исаева, 1982, 1984; Исаева, Преснов, 1990а). Неоднородное распределение ооплазматических детерминантов, в свою очередь, создает систему координат, "регуляторную архитектуру" яйца и зародыша, обеспечивающую пространственную регуляцию дифференциальной активности генов в эмбриогенезе (Davidson, 1986, 1987). Количественная или качественная неравномерность распределения в кортексе белков цитоскелета и сама по себе может определять различную судьбу кортекса, например преформируя место будущей инвагинации или иммиграции клеток при гаструляции. Такова роль миоплазмы яиц асцидий (Jeffery, 1990a,b).

Эти представления послужили основой для изображенной на рис. 31 схемы строения кортикального актинового цитоскелета яиц. Высокоупорядоченная анизотропная структура кортикального слоя, обусловленная связыванием субклеточных органоидов и макромолекулярных комплексов цитоскелетной сетью фибриллярного актина – общая черта пространственной организации любой яйцеклетки. Кортикальные микротрубочки и промежуточные филаменты, насколько известно, не представляют собой обязательные структуры яйцевой клетки. Помимо цитоскелетных элементов в кортексе яиц морского ежа (Terasaki, Jaffe, 1991; Terasaki, Sardet, 1991) и моллюска Nassarius (Speksnijder et al., 1989) обнаружена связная, регулярно организованная эндоплазматическая сеть, ассоциированная с рибосомами (Sardet, 1984; Terasaki, Sardet, 1991) и реорганизующаяся при оплодотворении яиц морского ежа с освобождением ионов кальция.

Важную роль в стабилизации и иммобилизации кортикального цитоскелета яйца играют надмембранные компоненты яйцевых оболочек. Вероятно, роль надмембранных яйцевых оболочек не сводится к общепринятой функции защиты яйца от полиспермии и подвреждающих внешних воздействий, но существенна также для стабилизации плазматической мембраны и кортикального слоя.

Исследования поляризации яиц различных организмов привели к заключению, что анизотропия распределения фибриллярного актина в яйце – результат поляризованного сокращения кортикальной цитоске-

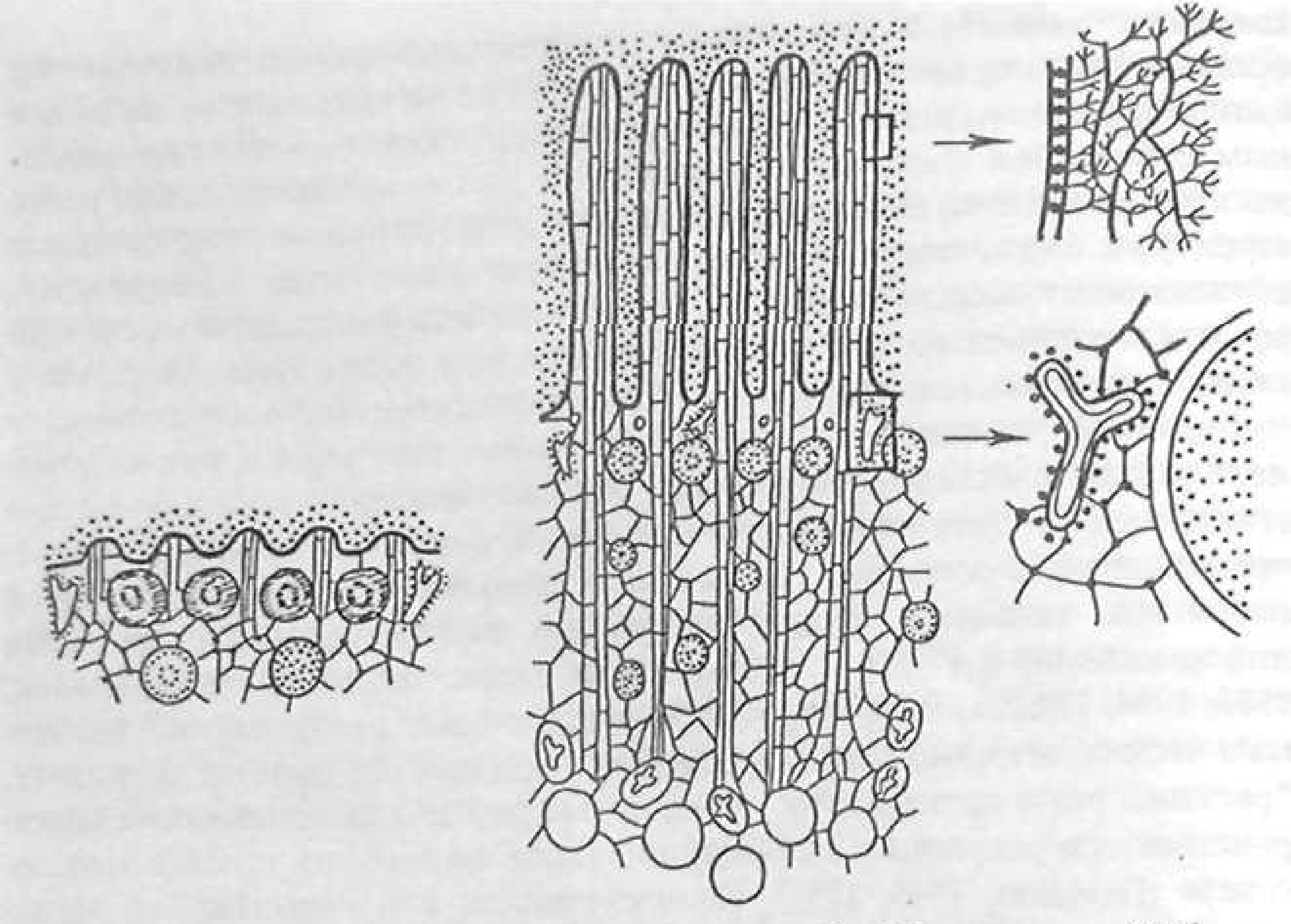


Рис. 31. Схема организации кортикального слоя яйца (Дроздов и др., 1987)

летной сети с сопутствующим пассивным перемещением всех связанных этой сетью мембранных органоидов и РНК, что приводит в итоге к поляризации их распределения, как и распределения микроворсинок и рецепторов поверхности (Christensen et al., 1984; Jeffery et al., 1984; Jeffery, 1985, 1990a,b; Brawley, Robinson, 1985; Ezzell et al., 1985; Shimizu, 1986; Fernandez et al., 1987; Sawada, 1988). Замечательный параллелизм между поляризованным сокращением кортикальной цитоскелетной сети в ходе ооплазматической сегрегации и перераспределением субклеточных структур, наиболее наглядно выявленный в яйцах кольчатых червей и асцидий, свидетельствует о том, что опорно-двигательная система клетки с характерной для нее двойственностью функций обеспечивает в яйце как фиксацию морфогенетических детерминантов, так и их перераспределение *при ооплазматической сегрегации*.

Процесс поляризации яиц обычно подавляется цитохалазинами – ингибиторами различных проявлений клеточной и субклеточной подвижности, зависящей от структурной организации системы актиновых филаментов, что свидетельствует о ведущей роли актиновых филаментов в процессе поляризации яиц различных организмов (см. ссылки в цитированных выше работах). Свидетельством участия актомиозинового комплекса в генерации силы при поляризованном сокращении кортикального слоя яиц служит подавление этого сокращения связанным с N-этилмалеимидом тяжелым меромиозином в яйцах Xenopus (Christensen et al., 1984; Ezzell et al., 1985) и Tubifex (Shimizu, 1985). Актомиозиновый механизм сокращения кортекса яиц Xenopus подтверждается и потерей сократимости после экстракции миозина с ее восстановлением при добавлении экзогенного миозина (Christensen et al., 1984). Данные о поляризованном распределении фибриллярного актина вдоль анимально-вегетативной оси яиц различных животных, а также о сопряженности поляризованного сокращения кортикальной сети актиновых филаментов яйца с перераспределением связанных этой сетью морфогенетических детерминантов приводят к заключению о функционировании опорно-двигательной системы яйцевой клетки в качестве глобального детерминанта проморфологии яйца. Поляризованное сокращение кортикального слоя, направленное к месту проникновения спермия и сопряженное с установлением дорсовентральной полярности, обнаружено в яйцах асцидий и шпорцевой лягушки (Ubbells et al., 1983; Jeffery et al., 1984; Sawada, Osanai, 1985).

Разумеется, становление и поддержание анизотропии ооплазмы, что детерминирует, в свою очередь, осевой паттерн яйца и зародыша, определяется морфофункциональной организацией всего интегрированного цитоскелета яйца, а не только лишь кортикальной сети актиновых филаментов. Уже были приведены сведения о направляющей поляризацию яйца функции системы микротрубочек. Чрезвычайно интересны и важны данные о зависимости локализации транскриптов гена bicoid в оогенезе дрозофилы от функционирования системы микротрубочек (Pokrywka, Stephenson, 1991).

Исследования, проводимые на соматических клетках, ведут к пониманию регулирующей и координирующей клеточный метаболизм (в частности, процессы трансляции, активность ряда энзимов) функции цитоскелета, прежде всего системы актиновых филаментов (см.: Schiwa, 1986). Нами выявлено поляризованное распределение фибриллярного актина в вителлогенных ооцитах некоторых иглокожих вдоль оси, определяемой местом прикрепления ооцита в яичнике. Вероятно, анизотропия распределения фибриллярного актина в ооцитах, задаваемая контактным взаимодействием ооцита со структурами яичника, в свою очередь, определяет морфофункциональную поляризованность яйцевой клетки, детерминирующую затем и осевую анизотропию будущего морфогенеза. Обработка цитохалазином зигот водоросли Pelvetia в период детерминации апикально-базальной полярности приводила к нарушению нормального униполярного паттерна: возникновению биполярных и мультиполярных форм с ризодами, локализованными на разных полюсах зародыша. Таким образом, экспериментальные данные и литературные сведения позволяют обосновать предположение о важнейшей морфогенетической функции кортикальной сети актиновых филаментов в детерминации осевой анизотропии яйца и проморфологии будущего зародыша.

Должно быть, актин играет центральную мультифункциональную роль в кортикальном опорно-сократительном комплексе, обеспечивая как поддержание формы и гетерогенности распределения компонентов мембраны и кортекса, т.е. пространственную память зиготы, так и проявления подвижности, а также участвуя в регуляции метаболизма: резкая активация белкового синтеза после оплодотворения коррелирует с изменениями состояния актина. Выполнение всех этих ролей одним

исполнителем – актином – обусловливает пространственную и временную динамичность и точность регуляции за счет перестроек комплексов актиновых *филаментов* с другими белками – соисполнителями каждой из функций.

Морфогенетическое значение поляризации цитоскелета яйца более существенно и *универсально*, чем определение судьбы отдельных зачатков. Интегрированная цитоскелетная *система* яйца в комплексе с мембранными системами – глобальный детерминант, определяющий проморфологию, *осевой* паттерн яйца, переводимый в ходе развития в осевой паттерн зародыша и взрослого организма *и тем самым* характеризующийся общим для всех организмов материнским эффектом.

Глава II

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ХОДЕ ДРОБЛЕНИЯ

СЕГРЕГАЦИЯ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА ЗИГОТЫ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ДРОБЛЕНИЯ

В предложенной впервые Морганом (Morgan, 1934) и развитой Дэвидсоном (Davidson, 1986, 1987) современной концепции дифференциальной активности генома клеток различных регионов зародыша с последующей цитодифференциацией необходимым условием реализации является сегрегация ооплазматических различий в ходе дробления яйца. Пространственный паттерн дифференциальной экспрессии генов в клетках *различных линий зародыша определяется взаимодействием специфических* регуляторных белков – продуктов регуляторных генов, транскрибируемых в ходе оогенеза, – с генами-мишенями ядер зародыша, как это показано на дрозофиле (Driever, Nüsslein-Volhard, 1989; Struhe et al., 1989; Nüsslein-Volhard, 1991). Анизотропия распределения в ооплазме белковых продуктов генов, детерминирующих осевой паттерн развивающегося организма, определяет и дифференциальное программирование экспрессии генома ядер зародыша дрозофилы: белки-морфогены перемещаются в соответствующих регионах зародыша из ооплазмы в ядра (Mlodzik, Gehring, 1987; Roth et al., 1989; Stewart, 1989; Nüsslein-Volhard, 1991). У раннего зародыша дрозофилы включается каскад взаимодействий мате*ринских и зиготических генов, детерминирующих пространственную* организацию личинки (Scott, O'Farrell, 1986; Tricoire, 1991; Ray et al., 1991). Однако стратегия раннего развития дрозофилы с сохранением синцитиальности зиготы до 13-го цикла ядерных делений существенно отличается от таковой у животных с полным дроблением ооплазмы.

При полном дроблении яйцеклетки становятся возможны межбластомерные взаимодействия (рассматриваемые ниже), в разной мере реализуемые у различных групп животных с более или менее ранних стадий развития. Жесткая детерминация судьбы бластомеров в развитии и строгая преемственность региональных различий ооплазмы, маркируемых естественным или искусственным образом, наиболее характерны для типа развития, соответственно *именуемого детерминированным или* мозаичным.

Помимо вошедших в классику исследований с маркированием час*тей яйца* и *зародыша*, *удалением* или умерщвлением бластомеров немало и недавних подобных работ, в частности, по картированию судьбы частей зародыша и прослеживанию линий в развитии с применением современных методов исследований (примеры таких работ на нематодах: Sulston et al., 1983; Cowan, McIntosch, 1985; Schierenberg, 1986; на дрозофиле: Technau, 1987; на асцидиях: Nishida, 1987; Venuti, Jeffery, 1989). При мозаичном типе развития ранняя, относительно автономная детерминация судьбы отдельных бластомеров зависит от распределения

в ходе дробления и *локализации в* цитоплазме каждого бластомера специфического набора продуктов материнских генов.

У животных с регулятивным типом развития, из которых наиболее исследован морской еж, в детерм*инации судьбы эмбриональных* клеток существенны и локализованные в ооплазме материнские факторы, и межбластомерные взаимодействия, обеспечивающие возможность эмбриональных регуляций (Davidson, 1987, 1989). Тем не менее первичный паттерн различий генной экспрессии в клетках эмбриона морского ежа определяется инвариантностью пространственной организации дробления, сегрегирующего ооплазму на пять первичных доменов, затем дающих клеточные линии определенной локализации и заданной судьбы в *развитии (Davidson, 1990; Cameron*, Davidson, 1991). Как показано работами группы Дэвидсона, дифференциальная экспрессия генов в бластомерах различных клеточных линий зародыша морского ежа контролируется связыванием регуляторн*ых белков с ДНК. Постепенно материнские* транскрипты замещаются транскриптами генома зародыша, специфичными для клеток различных линий (см.: Davidson, 1989; Cameron, Davidson, 1991; Gagnon et al., 1992).

Как уже было рассмотрено в гл. I, судьба частей дробящегося яйца может быть детерминирована разнообразными материнскими факторами, помимо непосредственно регулирующих транскрипцию генома белков. Эти факторы могут действовать на посттранскрипционном уровне путем регуляции трансляции, энзиматической *активности, внутриклеточного и* трансмембранного транспорта, затем уже опосредованно влияя на экспрессию генома клеток различных регионов зародыша. Морфогенетичес*кими факторами могут быть и неравно*мерно распределенные в ооплазме готовые к функционированию структурные белки цитоскелета, энзимы, клеточные органоиды; цитоскелетный матрикс ооплазмы интегрирует и регулирует морфофункциональную организацию ооплазмы. Пример хорошо изученного мультифункционального цитоскелетного домена-миоплазма (желтый серп) яйца асцидий – комплекс связанной с мембраной сети фибриллярного актина, промежуточных филаментов, митохондрий и других клеточных органоидов, специфический набор материнских информационных РНК. Отчетливая *асимметрия наследования* этого домена в ходе дробления детерминирует локальную судьбу данного региона зародыша; удаление или повреждение миоплазмы вызывает и глобальное нарушение эмбр*ионального* развития, предотвращая гаструляцию и осевой морфогенез (Jeffery, 1990a,b; Jaffery, Swalla, 1990). Подобный мультифункциональный комплекс исследован и у представителя кольчатых червей: *это поля*рная плазма, асимметричная сегрегация которой в ходе дробления детерминирует локальную и глобальную судьбу зародыша (Shimizu, 1988, 1989).

Значимость морфогенетической функции цитоскелетной сети в создании и поддержании ооплазматической гетерогенности поднимает вопрос о механизме сохранения ригидности цитоматрикса *в ходе* делений *дробления*, вовлекающих, как известно, существенную перестройку системы микротрубочек и актиновых филаментов. Как и при типичной цитотомии *клеток животных, при делениях* дробления яйца морского ежа в области сократительного кольца концентрируется фибриллярный актин, наблюдается и сопутствующее перераспределение белков актомиозинового комплекса (Yonemura, Kinoshita, 1986; Schroeder, 1987; Schroeder, Otto, 1988; Yonemura et al., 1991); эти перестройки кортикальной сети строго локальны и не затрагивают остальной поверхности дробящегося яйца.

Отчетливые региональные морфофункциональные отличия поверхности борозды первого деления дробления яйца морского ежа выявлены воздействием цитохалазином (Usui, Yoneda, 1989). Устойчивое поддержание особенностей наружной поверхности бластомеров 8-клеточных *зародышей морского ежа обнаружено даже после их диссоциации* (Yazaki, 1984; Nelson, McClay, 1988; Yazaki, Uemura, 1989). У зародыша шпорцевой лягушки устойчиво поддерживаются отличия предсуществовавшей мембраны и вновь образуемой мембраны борозды дробления (Tetteroo et al., 1984); анизотропия распределения в ооплазме митохондрий, элементов цитоскелета, региональная локализация антигенов сохраняются и в цитоплазме бластомеров (Wylie et al., 1985; Marinos, 1986). В яйцах Xenopus резкие отличия состояния мембранных компонентов анимального и вегетативного доменов поддерживаются до стадии 32 бластомеров (Dictus et al., 1984). Эти данные свидетельствуют о поддержании глобальной ригидности кортикального слоя и поверхности яйца, что ведет к сегрегации *регионов ооплазмы с различными морфогенетическими потенциями* в отдельные бластомеры или группы их.

С другой стороны, влияние митотического аппарата на актиновый *кортикальный цитоскелет вызывает не только локальное формирование* сократительного кольца (Rappaport, 1985; Rappaport, Rappaport, 1985), но и морфогенетически значимые перемещения компонентов ооплазмы, т.е. ооплазматическую сегрегацию в ходе раннего дробления, что найдено у представителей немертин (Freeman, 1978, 1979) и аннелид (Shimizu, 1989). Ассиметрия расположения митотического веретена, зависящая от фиксации одного из полюсов веретена кортикальным цитоскелетом, обеспечивает количественную и качественную асимметрию деления в раннем дроблении морского ежа (Dan, 1984; Schroeder, 1987), моллюска Spisula (Dan, Ito, 1984) и кольчатого червя Tubifex (Shimizu, 1989). Вероятно, подобное взаимодействие системы микротрубочек с кортексом яйца *контролирует и общий пространственный паттерн расположения веретен* в ходе дробления, и тем самым пространственную организацию различных типов полного дробления.

Неполное, поверхностное дробление дрозофилы имеет свои особенности связанной с митозами и цитотомией реорганизации цитоскелета: на ранних стадиях развития ядерные митозы не сопровождаются цитотомией, цитоскелет обеспечивает миграцию ядер к поверхности яйца (см.: Warn, 1986; Hatanaka, Okada, 1991a,b), где в ходе 10–13 циклов деления в синцитальной бластодерме синхронно протекают митотические преобразования системы микротрубочек и функционирует интегрированная сеть сократительных колец актиновых филаментов; целлюляризация бласто-

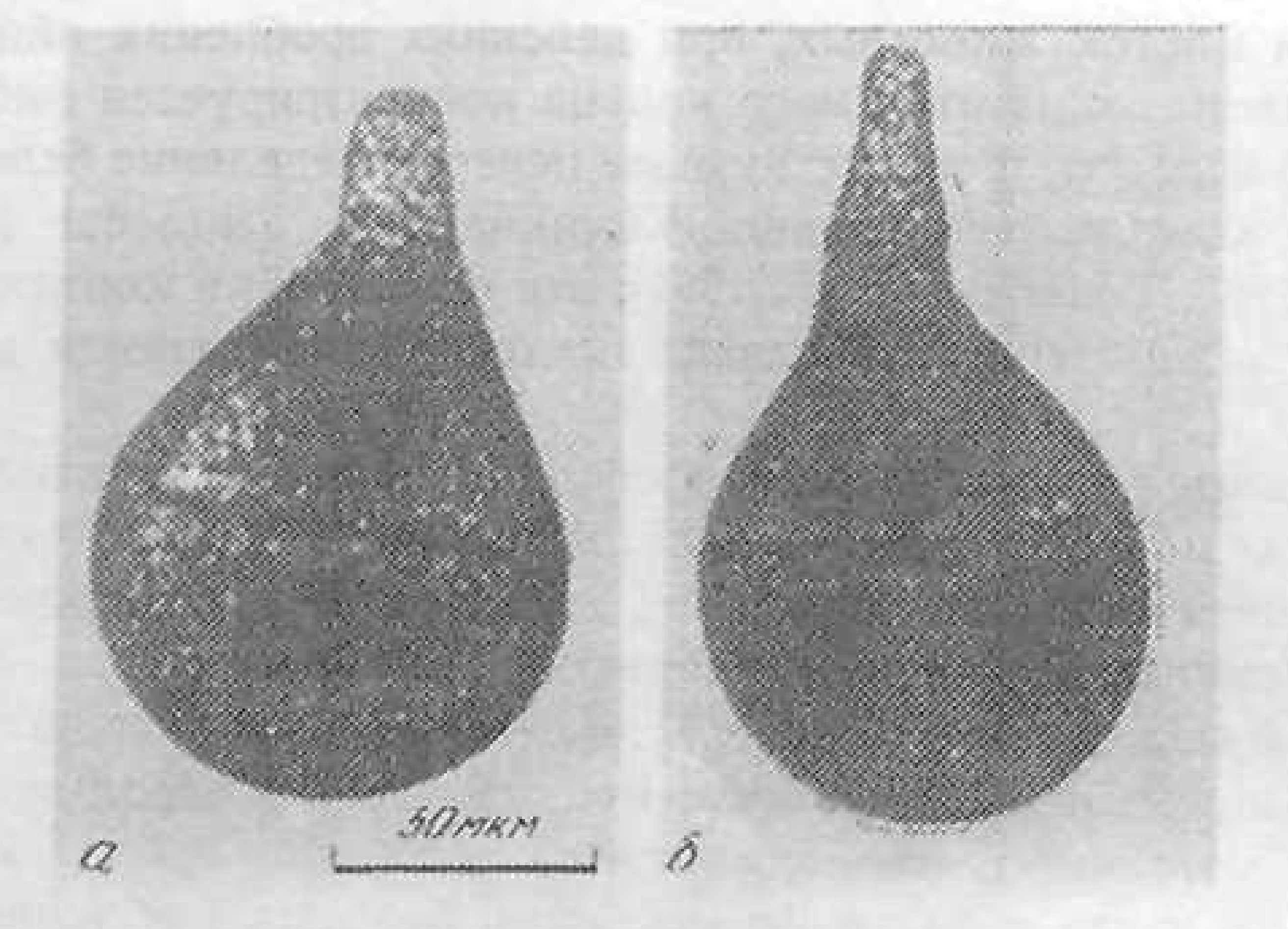


Рис. 32. Нормальный паттерн раннего дробления зиготы P. wrightii

дермы завершается в 14-м цикле деления (см.: Warn, 1986; Karr, Alberts, 1986).

Итак, в ходе дробления зиготы не только воссоздается многоклеточность развивающегося организма, но и осуществляется сегрегация морфогенетических потенций, наследуемых различными бластомерами и затем клеточными линиями.

Подобная сегрегация морфогенетического потенциала происходит и у зигот растений – при всех отличиях развития растений и животных. Эти отличия существенны: как известно, дробление зиготы растений идет одновременно с ростом зародыша; раннее дробление создает зародыш, морфологически и функционально поляризованный по апикально-базальной оси и сходный у представителей разных таксонов низших и высших растений. Механизм цитокинеза клеток растений тоже иной, чем у клеток животных: система микротрубочек веретена индуцирует формирование фрагмопласта, преобразующегося в клеточную пластинку, которая становится затем перегородкой между дочерними клетками. Уже первое деление зиготы растений асимметрично, разделяя две клетки с разной судьбой в развитии.

Асимметрия первого деления дробления наглядна у фукоидных водорослей. Так, в ходе нормального дробления зиготы Pelvetia wrightii, типичного для большинства представителей родов Fucus и Pelvetia, плоскость первого деления дробления проходит перпендикулярно апикально-базальной оси зародыша, отделяя клетку с уже начавшим отрастать ризоидом от полушария клетки будущего таллома. Плоскость второго деления параллельна плоскости первого и еще раз отделяет клетку ризоида от остальной, большей части зародыша (рис. 32, *а*). Плоскость третьего деления располагается вдоль апикально-базальной оси и делит надвое клетку будущего таллома (рис. 32, *б*). В ходе дальнейшего дробления чередуются перпендикулярные и параллельные основной оси зародыша деления, что ведет к ортогональному взаимному положению пластинок деления и затем клеточных стенок.

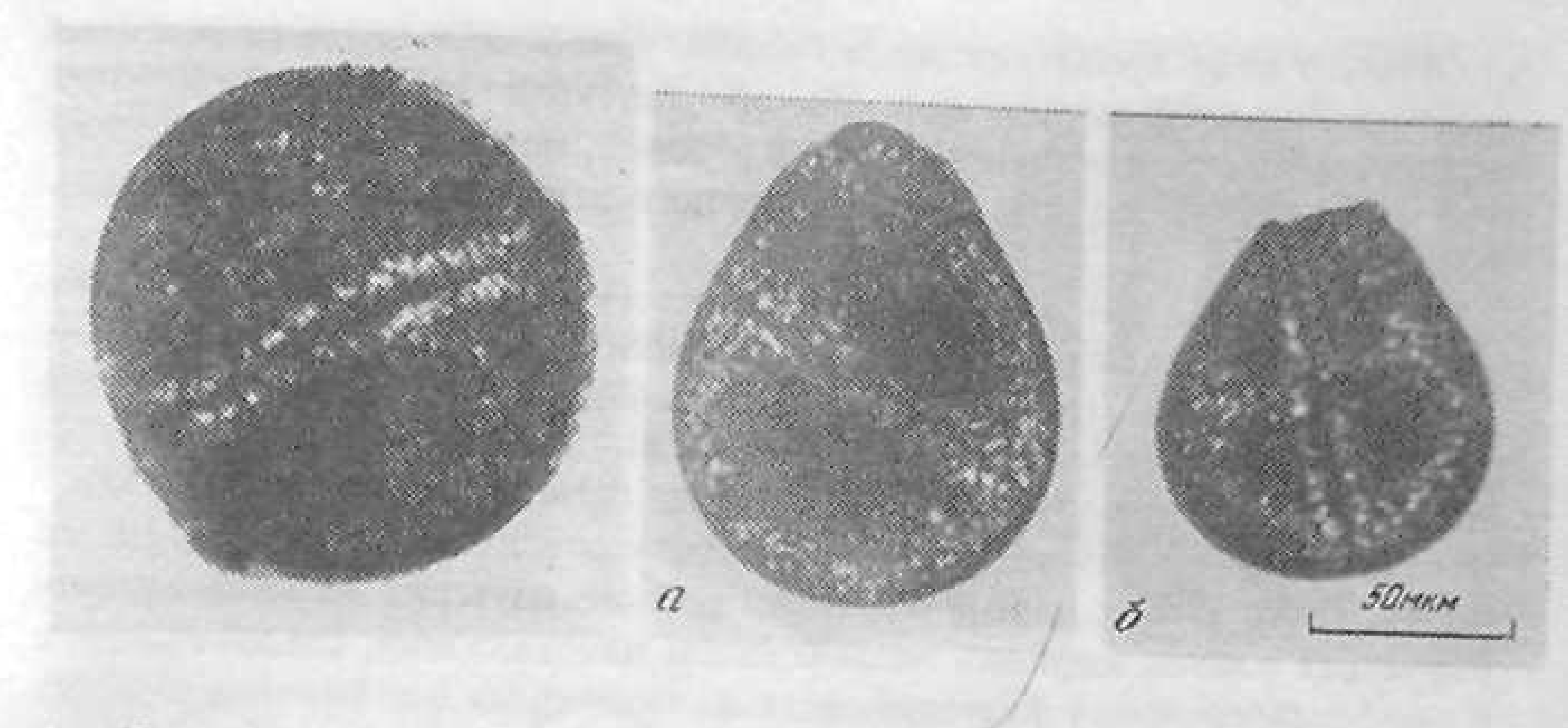


Рис. 33. Деление сферической зиготы P. wrightii после воздействия цитохалазином

Рис. 34. Нарушения пространственной организации дробления зигот P. wrightii после обработки цитохалазином

При исследовании влияния цитохалазина на осевой паттерн развивающихся зигот бурой водоросли Pelvetia wrightii были найдены и изменения характера раннего дробления. Поскольку уже первое деление зиготы у фукусовых водорослей асимметрично и разделяет зародыш на две морфофункционально различные клетки – клетку ризоида и клетку будущего таллома, экспериментальные модификации дробления цитохалазином дают возможность изучения морфогенетической функции раннего дробления фукусовых и участия фибриллярного актина в процессе деления растительных клеток.

Обработка цитохалазином В и D часто (примерно в половине случаев) нарушает нормальный паттерн дробления. Первое деление нередко осуществляется в еще сферической (рис. 33, *а*) или слегка вытянутой (рис. 33, *б*) зиготе до начала отрастания ризоида. В тех случаях, когда первое деление проходит после появления ризоида, плоскость деления часто оказывается расположенной по отношению к оси зародыша под углом, весьма далеким от прямого (рис. 34, *а*). Плоскости последующих делений дробления таких зигот ложатся перпендикулярно плоскости первого деления, создавая паттерн клеточных перегородок, косо пересекающих апикально-базальную ось зародыша. При одновременном появлении у обработанных цитохалазином зигот двух ризоидов на одном и том же полюсе плоскость первого деления иногда почти совпадает с основной осью зародыша (рис. 34, *б*). У биполярных зародышей клеточная перегородка первого деления иногда разделяет две зеркально-симметричные ризоидные клетки, чаще же отрастание ризоидов запаздывает, разделяются две клетки с не вполне явными признаками образования ризоидов на противоположных полюсах зародыша (см. рис. 33). При отсутствии полной симметрии расположения ризоидов геометрический паттерн клеточных делений в раннем дроблении оказывается нерегулярным (рис. 35).

Итак, в ходе дробления зигот Pelvetia, обработанных цитохалазином, наблюдались нарушения нормального паттерна дробления: деление, предшествующее появлению зачатка ризоида, косое положение плоскостей деления, совпадение плоскости первого деления с апикально-базальной осью зародыша.

Несмотря на отсутствие сократительного кольца актиновых филаментов у делящихся клеток растений, фибриллярный актин, по-видимому, выполняет существенную роль в детерминации положения плоскости деления (Lloyd, Traas, 1988; Lloyd, 1991a,b). Данные об изменении пространственной организации дробления зигот Pelvetia wrightii при обработке цитохалазином подтверждают результаты экспериментов Ллойда и Трааса (Lloyd, Traas, 1988) с переориентацией осевого паттерна деления культивируемых клеток моркови воздействием цитохалазина, свидетельствуя о морфогенетической функции системы актиновых филаментов в детерминации паттерна делений клеток растений.

Наглядная модель асимметричного деления в ходе дробления может быть представлена на материале искусственно деформированных яиц морского ежа Strongylocentrotus nudus (Исаева, Преснов, 1983; Преснов, Исаева, 1983, 1985). При этом сегрегация различных регионов ооплазмы яиц морского ежа, лишенных естественных морфологических маркеров ооплазматической гетерогенности, может быть визуализирована геометрически необычной формой какого-либо участка поверхности зиготы, что позволяет проследить его судьбу последовательно в ходе нескольких делений дробления.

На рис. 36 представлены последовательные стадии дробления одной из деформированных зигот одноклеточной стадии (*а*) до бластулы (*г*). Наглядна точность передачи геометрической формы деформированного участка характерной формы, наследуемого после второго деления дробления одним из четырех бластомеров (рис. 36, *б*) с последующим стойким воспроизведением формы до стадии бластулы.

Другой случай дробления деформированной зиготы представлен на рис. 37. При первом делении дробления деформированный участок наследуется одним из двух бластомеров (*б*), после второго деления этот маркер оказывается принадлежащим одному из четырех бластомеров (*в*) и после третьего – одному из восьми (*г*). Ни в одной из фаз митотического деления не наблюдалось осферивания делящегося яйца или бластомера: хотя в ходе митоза рельеф деформированной поверхности в какой-то мере сглаживается, геометрическая форма в основных чертах сохраняется, более точно восстанавливаясь после завершения каждого деления.

Устойчивость поддержания экспериментально полученных деформаций зигот морского ежа S. nudus в ходе дробления визуализирует общую ригидность, "замороженность" ооплазмы в сочетании со строго локализованной подвижностью при цитотомии. Судьба отдельных регионов яйца, маркированных необычной геометрией поверхности, их наследование на протяжении 6–7 последовательных циклов делений дробления моделируют асимметричное деление (при отсутствии каких-либо естественных маркеров ооплазматической гетерогенности).

Рис. 35. Аберрантный паттерн дробления биполярного зародыша P. wrightii (обработка цитохалазином)

Рис. 36. Модель асимметричного дробления: деформированное в эксперименте яйцо S. nudus от зиготы *(а)* до ранней бластулы *(г)*

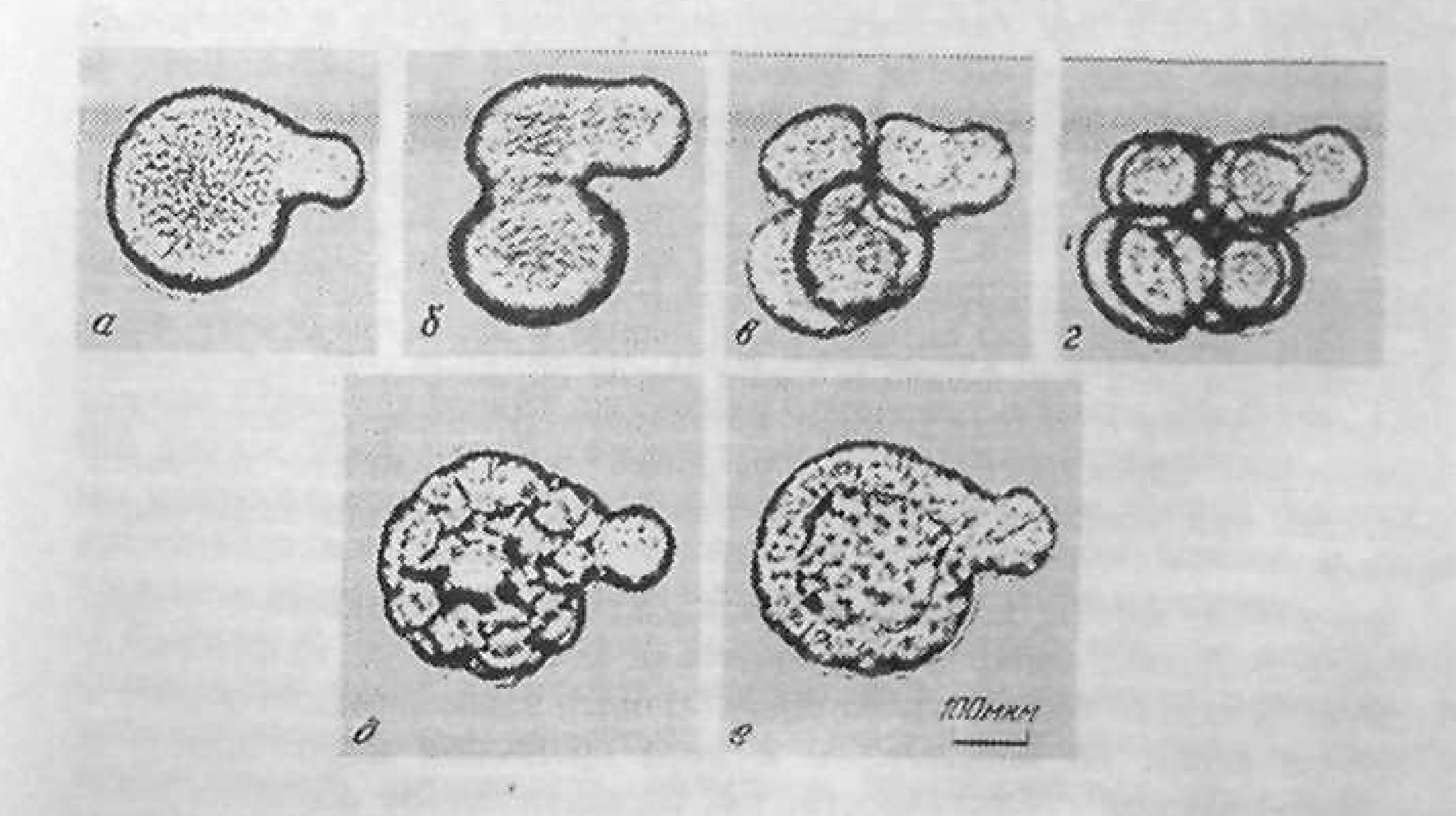


Рис. 37. Асимметричное дробление деформированной зиготы S. nudus с наследованием деформации от зиготы *(а)* до бластулы *(е)*

Обработка цитохалазином яиц и зародышей необычной формы, приводящая к их осфериванию, в то же время нарушает дальнейшее развитие.

Контакт гамет морского ежа сопровождается быстрой существенной перестройкой структуры кортикального слоя яйцеклетки с формированием мощного каркаса актиновых филаментов (см. выше); в течение нескольких первых минут после оплодотворения яиц морского ежа появляется жесткий кортикальный цитоскелет, фиксирующий форму яйцеклетки, сферическую в норме или экспериментально измененную. До появления жесткости кортикального слоя возможна "пластическая" деформация яйцеклеток с максимальным выходом уплощенных форм дробления; несколько позже, в процессе стабилизации кортикального слоя, остаются отдельные "слабые" места в кортексе – именно в это время возможно массовое появление выступов у яйцеклеток. Еще позже жесткий кортикальный слой сформирован, при сдавливании он разрывается с возникновением трещин; ригидный кортекс успешно выполняет функцию механической защиты яйцеклетки – доля деформаций резко падает (Исаева, Преснов, 1983).

Таким образом, механические деформации яиц морского ежа в период формирования ригидного кортикального цитоскелета ведут к появлению геометрически необычных форм яиц. Аберрантная форма яиц весьма точно поддерживается в ходе дробления до перехода к стадии средней бластулы, т.е. в течение первых 5–6 ч развития, на протяжении 6–7 последовательных циклов клеточных делений, формы яйца и зародыша "заморожена". Проведенные ранее экспериментально-эмбриологические работы свидетельствуют о значительной ригидности ооплазмы оплодотворенных яиц морского ежа. Вытянутые временным пребыванием в капилляре (Lindahl, 1933) или центрифугированием (Harvey, 1956; Hörstadius, 1973) и сразу же оплодотворенные яйцеклетки морского ежа сохраняют свою вытянутую форму в ходе дробления, тогда как неоплодотворенные яйцеклетки приобретают прежнюю сферическую форму. Обработка *цитохалазином В в первые 1–6 мин после осеменения вызвала* массовое появление выступов у яйцеклеток морского ежа; необычная форма сохранялась до гаструляции и влияла на характер дробления (Banzhaf et al., 1980). Такое действие цитохалазина наряду с эффектом осферивания деформированных зародышей S. nudus после обработки цитохалазином свидетельствует о необходимости интактного актинового цитоскелета дробящейся яйцеклетки для поддержания формы раннего зародыша морского ежа, сферической в норме или экспериментально деформированной.

Цитоскелет зиготы, играя существенную роль в детерминации формы раннего эмбриона, выполняет значительно более важную морфогенетическую функцию, связанную со стабилизацией после оплодотворения и распределением по бластомерам в ходе дробления кортикальной и ооплазматической гетерогенности, т.е. осуществлением ооплазматической локализации и сегрегации. Запоминание и воспроизведение геометрической формы яйца отчетливо выявляется именно на деформированных яйцах необычной формы: весьма точная передача геометрических

особенностей деформированного участка поверхности зиготы на протяжении нескольких последовательных делений дробления может рассматриваться в качестве модели ооплазматической локализации и сегрегации ооплазматической гетерогенности в ходе дробления; это уникальное свойство яиц, немыслимое применительно к соматическим делящимся клеткам. Асимметрия деления совершенно очевидна при дроблении у фукусовых водорослей и тех относительно немногочисленных животных, яйца которых несут какие-либо естественные морфологические маркеры ооплазматической гетерогенности.

Прослеживание судьбы отдельных регионов дробящегося яйца морского ежа, маркированных необычной геометрией поверхности, дает экспериментальную модель асимметричного деления при отсутствии каких-либо естественных маркеров региональных различий ооплазмы. При этом отчетливо выявляется общая ригидность ооплазмы и локальность ее изменений в ходе делений дробления. По-видимому, актин принимает участие в образовании и функционировании актомиозинового комплекса лишь в сократительном кольце борозды, тогда как в остальном кортексе входит по-прежнему в состав жесткого структурного комплекса с актинсвязывающими белками; при прохождении борозд дробления изменения кортикального цитоскелета локальны и не затрагивают кортекса в целом (см.: Hiramoto, 1974; Schroeder, 1981, 1987; Yonemura, Kinoshita, 1986; Schroeder, Otto, 1988).

Функция кортикального цитоскелета оплодотворенной яйцеклетки – фиксация, "замораживание" формы – оказывается как бы противоположной функции цитоскелета подвижных соматических клеток. Однако кортекс яйцеклетки способен к сократительной активности как в норме (цитотомия и другие проявления подвижности), так и при некоторых экспериментальных условиях, вплоть до амебоидной подвижности яйцеклетки (см. выше). Стабильность кортикального слоя не статична даже в раннем дроблении морского ежа: в ходе митотического деления наблюдается определенная степень потери исходной формы, с последующим возвратом к ней (например, см. рис. 37).

Полностью ригидного, застывшего состояния ооплазмы в ходе дробления нет и у яиц "мозаичного" типа: амебоидная подвижность бластомеров при первых делениях дробления отмечена у нематод (Малахов, 1981; Hill, Strome, 1990); к этой же категории проявлений подвижности ооплазмы можно отнести формирование широко известной полярной лопасти – временного выпячивания ооплазмы на вегетативном полюсе в ходе первого и второго делений яйца некоторых моллюсков и аннелид.

Возврат к исходной форме всего дробящегося яйца и отдельных бластомеров после временного проявления подвижности ооплазмы в ходе цитотомии свидетельствует о наличии неких механизмов памяти кортикального цитоскелета, возможно обусловленных стабильностью макромолекулярных комплексов, служащих центрами организации системы актиновых филаментов (см. гл. VI). Возможность участия актина в образовании либо ригидного комплекса с актинсвязывающими белка-

ми, либо сократительного комплекса с миозином экспериментально доказана Кейном на экстрактах яиц морского ежа (Kane, 1980, 1983).

Итак, у дробящихся яиц очень ярко проявляется сочетание общей ригидности, неподвижности с локальной контролируемой подвижностью. Эмбриологические исследования с использованием естественных различий пигментации, искусственной маркировки или повреждений различных областей кортекса показали поразительное постоянство локализации маркированных такими способами участков кортикального слоя дробящейся зиготы, поддержание кортикальной гетерогенности и топографической преемственности кортикальных регионов в ходе дробления, что обеспечивает преемственность локализации морфогенетически значимых различий и их сегрегацию путем дробления.

Пространственная организация бластомеров раннего эмбриона представляет собой устойчивую характеристику, имеющую таксономическое значение, эволюционно и генетически обусловленную и закрепленную. Тем не менее возможен экспериментальный анализ действия отдельных факторов, опосредующих проявление генетической программы развития в типе дробления или влияющих на реализацию этой программы. Экспериментальные исследования дробления могут прояснить, с одной стороны, морфогенетическую роль факторов, обусловливающих пространственную организацию дробления, с другой же – морфогенетические функции самого дробления в построении зародыша и возникновении новых механизмов морфогенетического контроля.

Как уже было показано, временная механическая деформация яиц в *период усиления ригидности кортикального цитоскелета* вызывает нарушения пространственной организации дробления; для получения и исследования модифицированных форм дробления применяли сжатие яйцеклеток морского ежа Strongylocentrotus nudus между стеклами вскоре после осеменения при стандартных условиях (Преснов, Исаева, 1983).

Такое воздействие вызывало уплощение яйцеклеток, уменьшавшееся, но не исчезавшее после устранения деформирующего воздействия и сохранившееся в ходе дробления – на стадии бластулы форма зародыша, как и форма зиготы, после прекращения сжатия близка к дискоидальной с отношением диаметра диска и толщины его около 2 (рис. 38, *а*, *в*). Плоскости первых двух делений дробления располагаются перпендикулярно плоскости уплощения зигот; каждый из первых двух бластомеров остается уплощенным; форма бластомеров после второго деления дробления также уплощенная (рис. 38, *б*).

При третьем делении возможны следующие варианты расположения бластомеров: псевдонормальное (8 бластомеров лежат двумя ярусами по 4 бластомера в каждом, но все бластомеры несколько сплющены) и измененное с тенденцией к однослойному расположению бластомеров. В последнем случае все 8 бластомеров были расположены в виде однослойной пластинки, розетковидной (рис. 39, *а*) в случае дискоидальной формы зиготы или вытянутой (рис. 39, *б*) при удлиненной форме зиготы. Чаще на этой стадии бластомеры располагались двумя неравными по числу

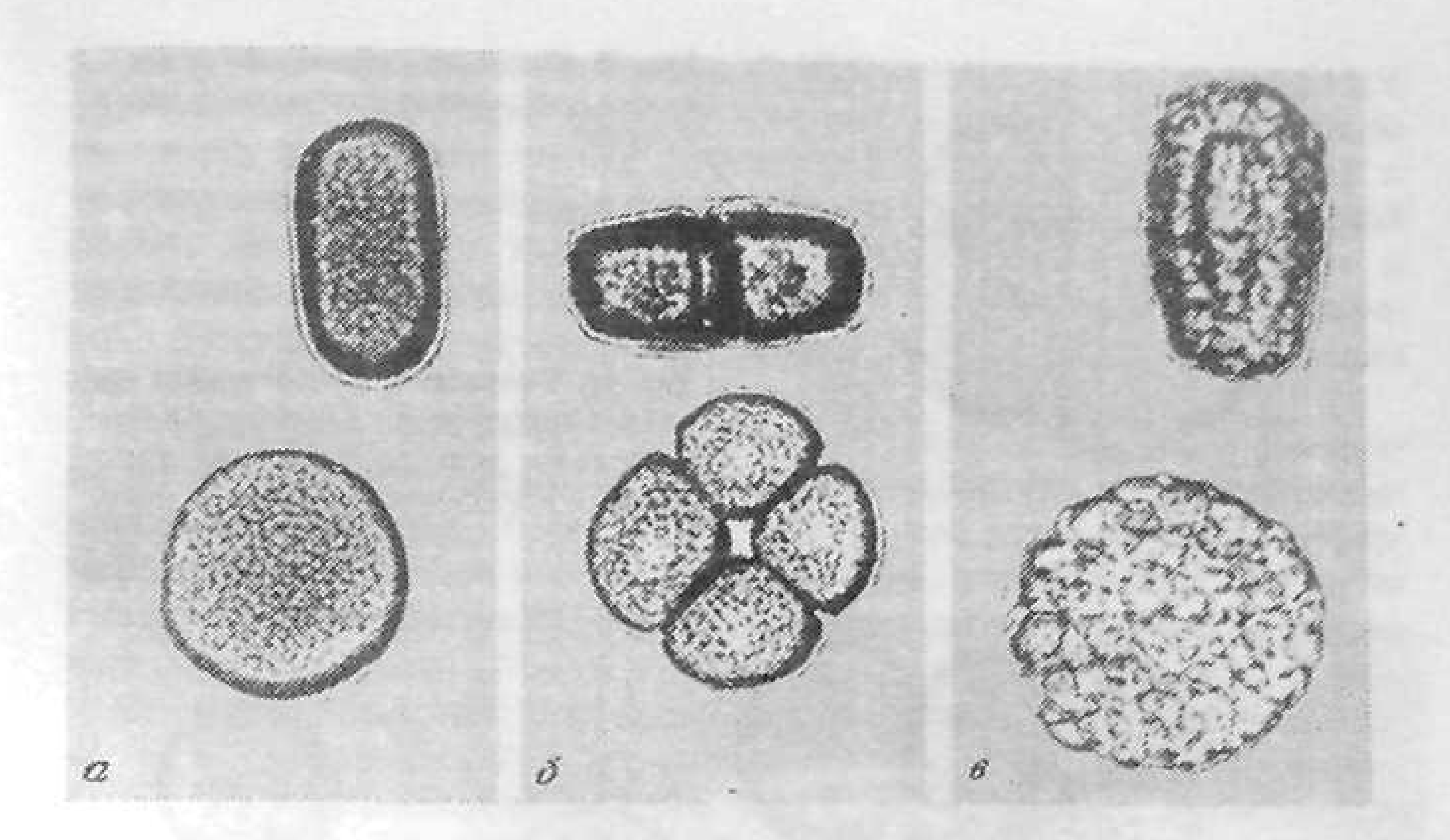


Рис. 38. Дробление деформированных зигот S. nudus (*а*) до стадии бластулы (*в*)
Фронтальная и боковая позиция (Преснов, Исаева, 1983)

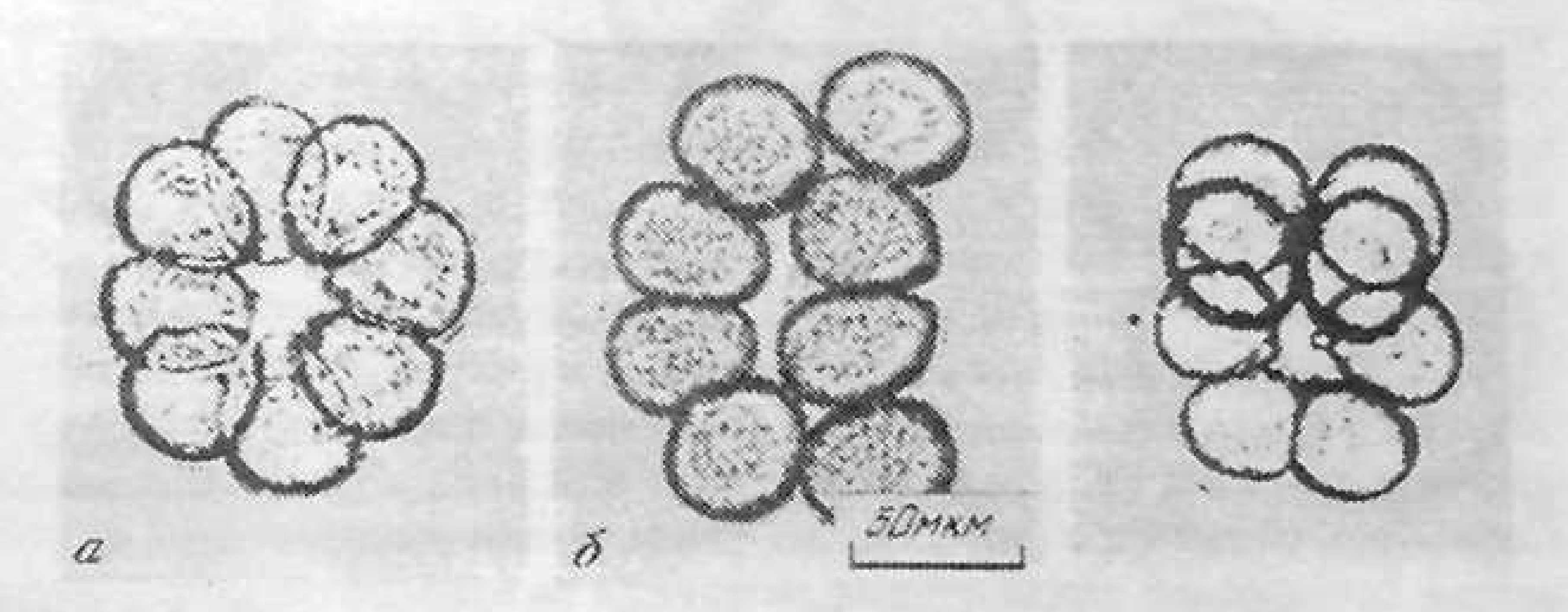


Рис. 39. Однослойное расположение бластомеров после третьего деления дробления деформированных яиц S. nudus.
а – уплощенного; *б* – уплощенного и удлиненного

Рис. 40. Расположение бластомеров S. nudus третьего деления дробления уплощенных яиц двумя неравными по числу клеток ярусами (Преснов, Исаева, 1983)

клеток ярусами, т.е. группировками 5+3, 6+2 (рис. 40), 7+1 вместо типичного для морского ежа расположения бластомеров двумя квартетами (4+4).

При формировании однослойной розетки или пластинки восьми бластомеров (см. рис. 39, *а*, *б*) все 4 веретена III деления ложатся параллельно плоскости сдавливания. В случае ориентации лишь некоторых из веретен III деления параллельно плоскости уплощения, остальных перпендикулярно или косо возникают группировки с неравным числом

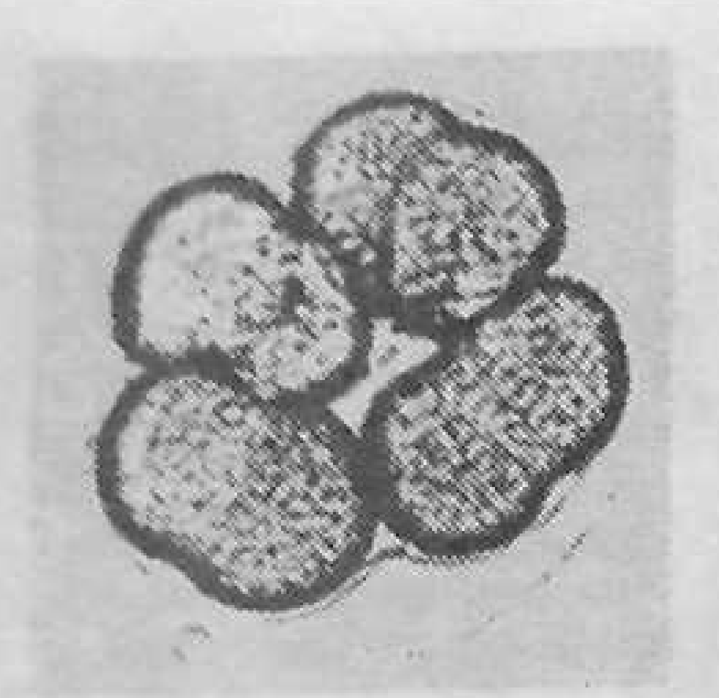


Рис. 41. Имитация спирального дробления: третье деление уплощенных зигот S. nudus

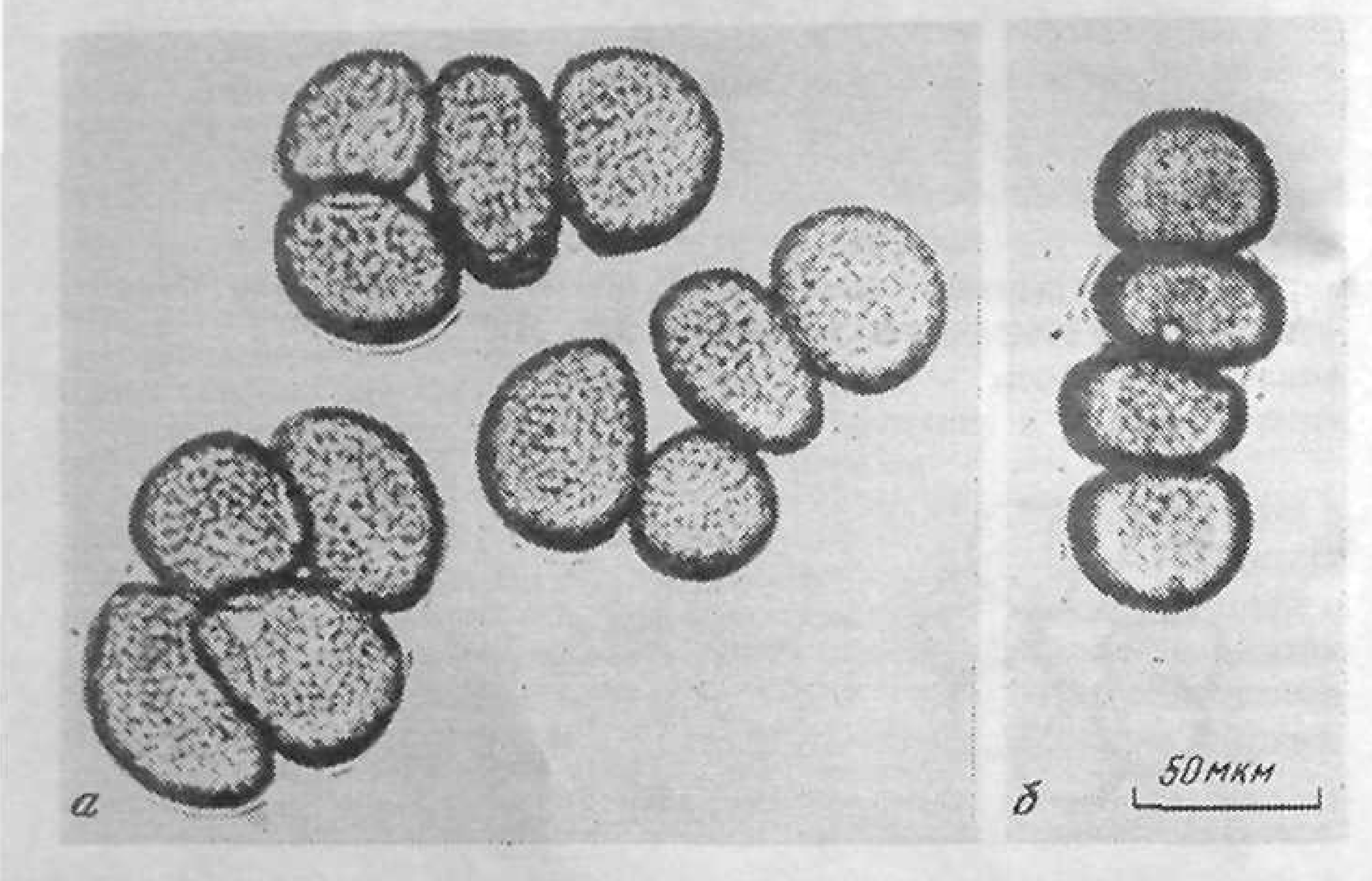


Рис. 42. Т-образная, ромбоидная и линейная группировки бластомеров после второго деления дробления уплощенных и удлиненных зигот S. nudus

бластомеров в каждом ярусе. При косой ориентации всех веретен III деления относительно плоскости сжатия сестринские пары бластомеров двух клеточных ярусов располагаются с взаимным смещением, имитирующим черты спирального типа дробления (рис. 41).

IV деление дробления у зародышей с однослойным расположением бластомеров приводит к образованию второго яруса бластомеров, а у двухъярусных зародышей – к трехъярусному расположению клеток. В результате последующих нескольких делений всех подвергнутых сжатию зигот, как правило, образуются однотипные (независимо от вариантов раннего дробления) уплощенные бластулы типа плакулы (см. рис. 38, *в*).

У сплющенных при стандартных условиях яйцеклеток возможно возникновение округлых выступов, сохранившихся после прекращения сжатия; необычная форма яйцеклеток поддерживалась до бластулы (см. рис. 36, 37). Как правило, у каждой яйцеклетки возникал один лишь выступ большего или меньшего *размера, но изредка встречались* яйцеклетки с 2–3 подобными лопастями. Сочетание уплощения яйцеклетки с образованием лопастного выступа или вытягиванием (при небольшом смещении покровного стекла относительно предметного) приводит к возникновению уплощенно-лопастной или уплощенно-удлиненной формы зиготы после прекращения деформирующего воздействия и дроблению с появлением ромбоидной, Т-образной и линейной группировок бластомеров, имитирующих "нематодный фенотип" дробления (рис. 42).

Описанные отклонения от нормальной сферической формы дробящихся зигот с сопутствующими модификациями характера дробления оказались вполне регулируемыми. Регуляция формы развивающихся деформированных яйцеклеток происходила при эпителизации бластулы (стадия средней бластулы) – бластулы обретали нормальную сферическую форму.

При стандартных условиях сдавливания доля эмбрионов, развитие которых блокировалось при дроблении и которые не достигали стадии гаструлы, не превышала 5%. Все остальные эмбрионы после начала гаструляции и до стадии 3–4-суточных плутеусов были неотличимы от контрольных нормальных эмбрионов.

Изменив условия сжатия яйцеклеток, можно получить и значительно более уплощенные, лепешковидные формы, неспособные, однако, к развитию. Удлиненная форма оплодотворенных яйцеклеток, вытянутых временным пребыванием внутри капилляра, также оказывалась фиксированной, сохраняясь при дроблении. Путем сдавливания в капилляре можно получить сильно вытянутые яйцеклетки червеобразной формы, но *зиготы такой формы не приступали к дроблению.* Соотношение длины и ширины вытянутых капилляром и способных к развитию зигот не превышало 2–2,5. По-видимому, более значительные деформации яйцеклеток как вытянутой, так и уплощенной формы не совместимы с развитием.

Примененные механические воздействия часто деформировали оболочку оплодотворения или удаляли ее; наличие, отсутствие или форма оболочки оплодотворения не влияли на поддержание измененной формы яйцеклетки. Для поддержания целостности зародыша морского ежа в раннем дроблении оказывается весьма существенным наличие и сохранение гиалинового слоя (Vacquier, Mazia, 1968; Spiegel, Spiegel, 1979; Adelson, Humphreys, 1988; Alliegro, McClay, 1988). У деформированных эмбрионов S. nudus с измененным паттерном дробления гиалиновая оболочка нормальной морфологии эластично облегала поверхность, по-видимому, успешно выполняя функцию поддержания целостности дробления зиготы и стабилизации ее формы – в данных экспериментальных условиях аберрантной.

Еще в 1983 г. Дриш (Driesch, 1893) показал, что сдавливание дробящихся яиц морского ежа между стеклянными пластинками приводит к существенному изменению пространственной организации бластомеров (расположению их в виде однослойной пластинки клеток на стадии 8–16 бластомеров) без потери способности таких геометрически измененных зародышей к дальнейшему нормальному развитию. Перестройки дробле-

ния отмечены также у вытянутых кратковременным пребыванием в капилляре (Lindahl, 1933), центрифугированных (Harvey, 1956) или подвергнутых иным механическим воздействиям (Rappaport, 1975) яиц морского ежа. У таких вытянутых яиц морских ежей веретено и борозда I деления дробления располагаются, как и при дроблении внутри капилляра, в соответствии с правилами Сакса–Гертвига (см.: Иванова-Казас, 1975; Белоусов, 1980).

При дальнейшем делении центрифугированных яиц морского ежа или их фрагментов Харви наблюдала Т-образное расположение бластомеров (Harvey, 1956). Т-образную группировку бластомеров морского ежа получил также Раппопорт (Rappoport, 1978) путем сжатия одного из двух первых бластомеров внутри капилляра. У сдавленных между стеклянными пластинками эмбрионов морского ежа, если судить по рисункам в работе Дриша (Driesch, 1893), возможно ромбоидное расположение 4 бластомеров при плотной упаковке их. Разрушив трипсином яйцевые оболочки, В.Н. Мещеряков и Л.В. Белоусов (1973) получили после II деления дробления яиц двух видов моллюсков весь спектр фигур, наблюдающихся в нормальном раннем развитии нематод.

Как оказалось, для существенной перестройки пространственной организации дробления зигот морского ежа достаточно применить механическое воздействие в течение относительно короткого периода времени после контакта гамет. Изменения характера дробления при этом подобны наблюдавшимся ранее у зародышей морских ежей, сжатых между стеклами на протяжении всего периода дробления (Driesch, 1893; Morgan, 1927).

Таким образом, цитоскелет зиготы, "запоминающий" и поддерживающий деформацию, выполняет ту же функцию, что и постоянно приложенное в течение дробления механическое воздействие. Измененная пространственная организация бластомеров после сжатия зиготы имитирует картины дробления Nemathelminthes, Tentaculata и даже спиральное дробление. Возможно, что варианты дробления у сжатых вскоре после оплодотворения и затем освобожденных зародышей морского ежа в наших опытах зависели от положения анимально-вегетативной оси яйца относительно направления сжатия; не исключено, что косое положение веретен дробления и имитация спирального смещения бластомеров определялись косым взаимоположением оси яйца и направления сжатия. Расположение бластомеров на 8-клеточной стадии одним слоем и уплощенная бластула (плакула) при наличии тонких и эластичных яйцевых оболочек встречаются среди представителей мшанок и плеченогих. Можно предположить роль к..ртикального слоя яйца в определении такого типа дробления по аналогии с экспериментальным изменением формы и характера дробления зародышей морского ежа. Следует отметить, что и у животных с жесткими удлиненными яйцевыми оболочками морфогенетическая роль оболочек в пространственной организации дробления может дополняться влиянием кортикального цитоскелета самой яйцеклетки. В любом случае морфогенетическая функция кортикального слоя яйца в детерминации пространственной организации

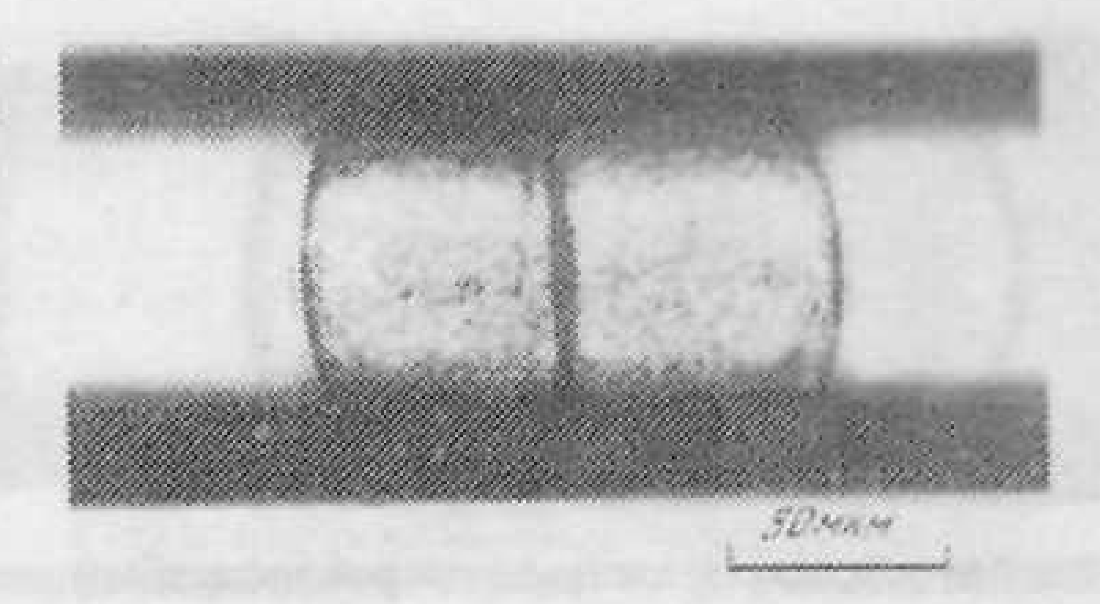


Рис. 43. Ориентация борозды первого деления дробления яйца S. nudus в капилляре (Преснов, Исаева, 1982)

дробления весьма существенна. По-видимому, ригидный кортекс зиготы и ранних бластомеров морского ежа определяет геометрию расположения митотических веретен и тем самым плоскости цитотомии.

Относительно простыми для экспериментального анализа и легко моделируемыми факторами, также, вероятно, влияющими на геометрию дробления, являются свойства яйцевой оболочки (оболочек): жесткость или эластичность ее, форма (сферическая или удлиненная), а также наличие или отсутствие свободного пространства между оболочкой и поверхностью дробящегося яйца. По всем эти признакам достаточно контрастно различаются дробящиеся яйца морских ежей и нематод; весьма существенны и различия типа раннего дробления этих групп животных. Сделана попытка экспериментального моделирования жесткой цилиндрической оболочки, сжимающей и удлиняющей зародыш, путем помещения оплодотворенных и дробящихся яиц морского ежа Strongylocentrotus nudus внутрь капилляра с целью исследования влияния этих экспериментальных условий на пространственную организацию дробления (Преснов, Исаева, 1982).

При помещении в капилляры зародышей незадолго до появления борозды I деления дробления проскость борозды всегда располагалась перпендикулярно длинной оси сдавленного капилляром яйца (рис. 43). Плоскость борозды II деления обычно проходила вдоль длинной оси яйца. Цитотомия помещенных внутрь капилляра оплодотворенных или уже дробящихся яиц чаще всего блокировалась после осуществления одного-двух последовательных делений (вероятно, прежде всего из-за недостатка кислорода, так как дробление яиц, располагающихся в капиллярах вблизи границы с воздушной фазой, шло до образования бластулы). В капилляре наблюдалось подавление цитотомии одного из бластомеров при делении другого, асинхронность деления бластомеров, а также исчезновение уже возникшей борозды дробления. Во всех этих случаях после стадии двух бластомеров появилась группа из трех бластомеров, не свойственная нормальному дроблению морского ежа и имитирующая фигуры дробления некоторых Nemathelminthes (см.: Иванова-Казас, 1975).

Для исследования пространственной организации бластомеров на стадиях 4–16 клеток в капилляры помещали уже дробящиеся яйца на стадии 2 или 4 бластомеров; в капилляре проходили еще 1–2 деления дробления, после чего дальнейшее развитие блокировалось. При разру-

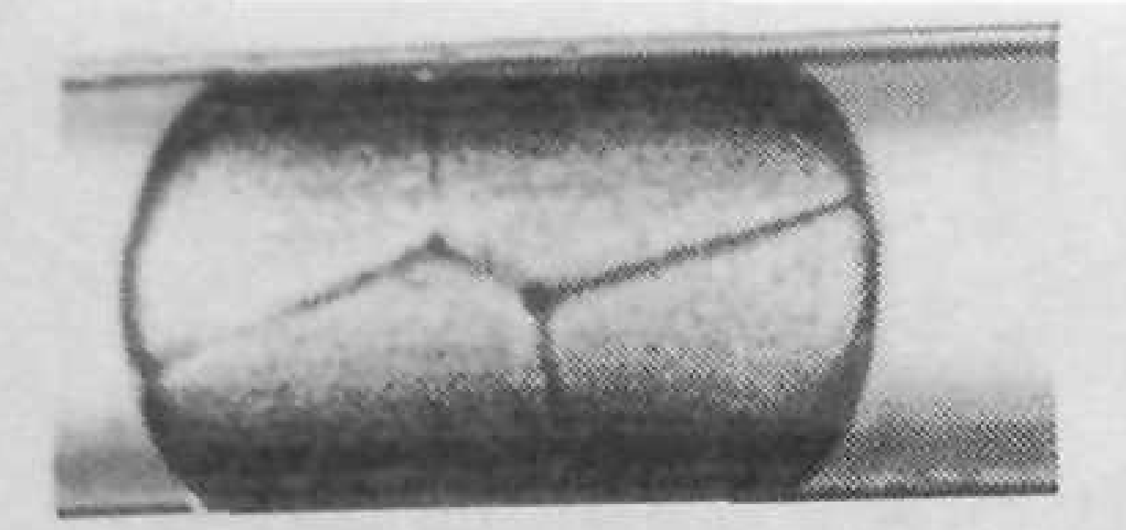


Рис. 44. Ромбоидная диссимметричная группировка четырех бластомеров при дроблении яйца S. nudus в капилляре (Преснов, Исаева, 1982)

шении оболочки оплодотворения наблюдали существенные перегруппировки бластомеров вплоть до линейного расположения их, имитирующего картину дробления некоторых нематод. Однако, поскольку при разрушении оболочки может утрачиваться связь между бластомерами, рассматривались изменения в расположении бластомеров лишь у эмбрионов с сохранившейся оболочкой оплодотворения.

Сдавливание стенками капилляра эмбрионов, помещенных в него на стадии 4 бластомеров, при косом положении плоскостей дробления относительно длинной оси капилляра приводило к существенному смещению бластомеров и возникновению в итоге плотной упаковки бластомеров вместо ортогональной и диссиметричному ромбоидному расположению их вместо квадратного (рис. 44), т.е. возникало сходство с типичной для нематод организацией четырехклеточного эмбриона. Изредка наблюдалась характерная для аскарид Т-образная группировка бластомеров. При помещении в капилляр 2-клеточных зародышей оба бластомера, как правило, оказывались расположенными один за другим по длинной оси капилляра; при последующих делениях не нарушалась свойственная раннему дроблению морского ежа ортогональность упаковки бластомеров, но появлялась отчетливая билатеральность их расположения. Подобное сочетание ортогональности и билатеральной симметрии наблюдали и при дроблении в капилляре эмбрионов, помещенных в него в стадии 4 бластомеров и сжатых капилляром в такой позиции, когда одна из плоскостей дробления оказывалась параллельной, а другая – перпендикулярной длинной оси капилляра.

При дальнейшем дроблении таких эмбрионов мезомеры на 16-клеточной стадии располагались двумя рядами по 4 клетки (рис. 45). При IV делении дробления в капилляре *бластомеры вегетативной половины* зародыша наряду с типичным для морского ежа неравномерным делением, приводящим к образованию микромеров, часто претерпевали равное деление (рис. 46). В итоге иногда при равном делении всех четырех вегетативных бластомеров в капилляре можно было наблюдать билатерально-симметричный 16-клеточный зародыш, состоящий из двуслойных рядов клеток равного размера по 4 клетки в каждом ряду (имитация дробления некоторых представителей Tentaculata).

Внецитотомическое смещение бластомеров, вызванное сдавливанием и вытягиванием 4-клеточного зародыша морского ежа стенками капилляра, приводит к существенному изменению пространственной организации этого зародыша – происходит сдвиг к "нематодному фенотипу" расположения бластомеров. Поскольку для такой значительной перестройки



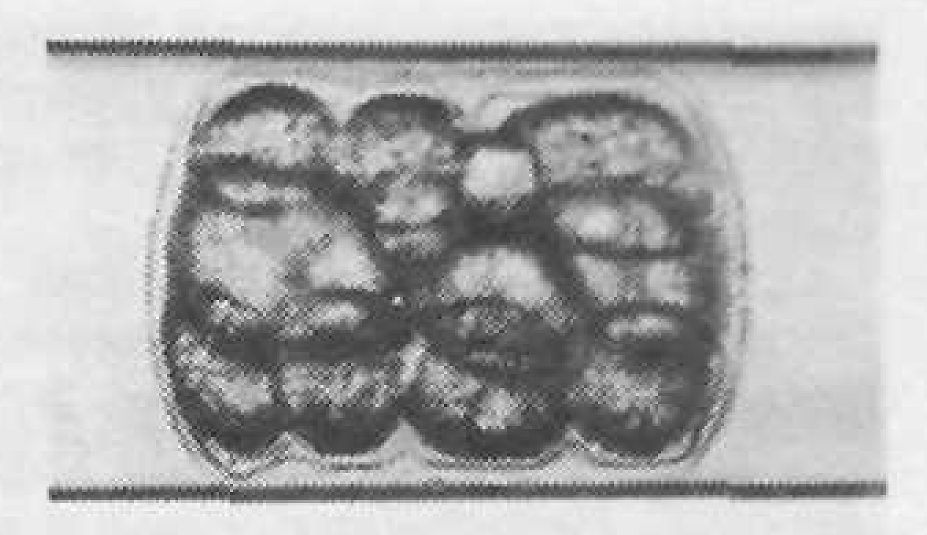


Рис. 45. Билатеральное расположение мезомеров после четвертого деления дробления яйца S. nudus в капилляре (Преснов, Исаева, 1982)

Рис. 46. Нарушение характера деления вегетативных бластомеров

Результат четвертого деления дробления яйца S. nudus в капилляре (Преснов, Исаева, 1982)

пространственной организации бластомеров достаточно механического сжатия зародыша стенками капилляра, естественно предположить подобное – сдавливающее и вытягивающее – воздействие жесткой удлиненной оболочки в раннем дроблении нематод. У нематод ромбовидная группировка бластомеров обычно возникает путем смещения бластомеров после цитотомии. Дробление, начинающееся у разных видов нематод по-разному, приходит затем почти всегда к сходной ромбовидной стадии, после чего уже не обнаруживает особенно значительных вариаций (см.: Иванова-Казас, 1975). Возможно, появление ромбоидной группировки у нематод хотя бы отчасти вызывается механическими причинами – сдавливающим и вытягивающим воздействием яйцевой оболочки.

Подобным образом можно пытаться объяснить и некоторые другие черты дробления Nemathelminthes, имитируемые при заключении в капилляр дробящихся яиц морского ежа. Сдавливанием и вытягиванием дробящегося яйца оболочкой можно в какой-то мере объяснить в утрату явных черт спиральности дробления у большинства нематод. Кратковременная стадия тетраэдра, переходящая за счет смещения бластомеров в ромбическую, отмечена лишь у одного представителя нематод как примитивная черта (Малахов, Черданцев, 1975). У некоторых представителей членистоногих с полным дроблением и жесткими, плотно прилегающими яйцевыми оболочками сферической или слегка вытянутой формы (Crustacea, Pantopoda – см.: Иванова-Казас, 1979) сдавливание дробящегося яйца без существенного его вытягивания приводит к компактизации тетраэдрической группировки без перехода ее в ромбическую, т.е. без потери непосредственного контакта друг с другом всех четырех бластомеров и оттеснения двух из них к периферии, что происходит при сдавливании в сочетании с вытягиванием.

Морфогенетическая роль яйцевой оболочки нематод в определении расположения бластомеров раннего зародыша уже предполагалась (Nigon et al., 1960; Мещеряков, Белоусов, 1978). У других групп животных с плотно прилегающими жесткими яйцевыми оболочками удлиненной формы, например погонофор, тоже вполне вероятно влияние такого рода оболочек на характер дробления. В всяком случае, механические и

геометрические особенности яйцевых оболочек не следует игнорировать при сравнительном анализе пространственной организации дробления и факторов, детерминирующих тип дробления (Преснов, Исаева, 1982, 1985; Гуреева, 1986).

Ортогональный билатеральный тип расположения бластомеров на 16-клеточной стадии внешне сходен с картинами дробления некоторых Tentaculata (см.: Иванова-Казас, 1977). Однако у Tentaculata, проходящих подобную стадию дробления (некоторые мшанки и плеченогие), яйцевые оболочки, по-видимому, тонки и эластичны и поэтому вряд ли могут играть морфогенетическую роль в билатеральной организации расположения бластомеров. Пониманию факторов возникновения билатерально-симметричной ортогональной упаковки бластомеров у удлиненного или уплощенного эмбриона может помочь другая экспериментальная модель – дробление яиц морского ежа, оплодотворенных сразу после центрифугирования или прохождения через капилляр и сохранивших вытянутую форму (*Lindahl, 1933; Harvey, 1956 и наши данные*); в этих случаях характер дробления также значительно отличается от типичного для морского ежа, хотя вытягивающее механическое воздействие устранено.

Такие данные предоставляют возможность экспериментального анализа влияния ригидного кортикального цитоскелета и всей поверхности зиготы в комплексе с внеклеточным матриксом (гиалиновым слоем у зигот морского ежа) на пространственную организацию бластомеров.

Удаление же оболочек зиготы ведет к нарушению целостности дробящегося яйца и изоляции бластомеров, полной или частичной, давая возможность исследования роли межбластомерных взаимодействий в раннем дроблении.

МЕЖКЛЕТОЧНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ В ХОДЕ ДРОБЛЕНИЯ

Сегрегация ооплазматической гететогенности с наследованием разного морфогенетического потенциала бластомерами, дающими затем различные клеточные линии зародыша, лишь одна из функций дробления. В ходе дробления создается возникающая заново гетерогенность в пределах каждого бластомера, становятся возможными и межбластомерные взаимодействия. Экспериментальные воздействия, нарушающие нормальные связи между бластомерами, вызывают аномалии развития, что позволяет судить как о регулятивных возможностях изолированных друг от друга бластомеров, так и о характере их взаимодействий в развитии.

Дополнительная анизотропия комплекса цитоскелет–плазматическая мембрана в пределах каждого бластомера возникает как за счет различий предсуществовавшей и возникшей вновь в ходе дробления поверхности, так и за счет поляризации бластомеров, *определяемой их контактными* взаимодействиями. Морфологические и функциональные различия предсуществовавшей наружной и вновь образованных контактных поверхностей бластомеров неоднократно отмечены. Такие различия

наиболе детально изучены у зародышей иглокожих и млекопитающих. Морфофункциональное несходство наружной поверхности ("старого" кортекса, унаследованного от зиготы) и внутренних, контактных или обращенных в бластоцель, по-видимому, играют важную морфогенетическую роль (Wolpert, Mercer, 1963; Мещеряков, Белоусов, 1978; Божкова, 1987; Исаева, Преснов, 1987).

Апикальная (наружная) поверхность бластомеров морского ежа *8-клеточной стадии развития отличается от базолатеральной комплексом* морфологических и иммуноцитохимических особенностей, так что поверхность каждого бластомера оказывается состоящей из двух различных доменов (Yazaki, 1984, 1991; Nelson, McClay, 1988; Yazaki, Uemura, 1989). В процессе реагрегации клетки ранней бластулы, сначала располагающиеся случайным образом, реориентируются затем в соответствии с положением в агрегате, причем апикально-базальная полярность каждого бластомера остается неизменной (Nelson, McClay, 1988). Совпадение распределения антигенов-маркеров апикальной поверхности с концентрацией фибриллярного актина и нарушение локализации антигенов обработкой цитохалазином (Nelson, McClay, 1988; Yazaki, 1991) свидетельствуют об участии системы актиновых филаментов в поддержании поляризованной организации каждого из бластомеров.

Поляризация бластомеров морского ежа отчетливо выражена при четвертом делении дробления, проявляясь и при делении бластомеров в условиях их изоляции (Schroeder, 1988). У 16-клеточных зародышей морского ежа бластомеры структурно поляризованы: микроворсинки и пигментные гранулы кортекса характеризуют апикальную (наружную) *поверхность, тогда как базолатеральная поверхность бластомеров* гладкая и непигментированная. Шредер показал, что изолированные бластомеры морского ежа, лишенные контакта друг с другом и с внеклеточным гиалиновым слоем, способны к автономной поляризации (при сохранении, однако, контакта пары макромер–микромер). После IV деления дробления возникают характерные особенности вегетативного полюса зародыша морского ежа, проявляющиеся в отсутствие микроворсинок, пигментных гранул либо иных мембранных везикул (Schroeder, 1980b, 1982, 1986; Dan, 1984).

Как фиксация пигментных гранул в кортикальном слое яйца, так и их перемещение, приводящее к очистке вегетативного полюса от пигмента, подавляются цитохалазином, поэтому предполагается ассоциация пигментных гранул с актиновыми филаментами кортекса (Sawada, Osanai, 1980; Schroeder, 1980b; Tanaka, 1981). Поскольку цитоскелетную основу микроворсинок, располагающихся по всей поверхности раннего зародыша морского ежа (за исключением зоны вегетативного полюса), составляет осевой пучок актиновых филаментов, связанных фесцином, вегетативный полюс оказывается лишенным жесткого кортикального цитоскелетного *комплекса, существенными компонентами которого служат поли*меризованные актин и фасцин (см.: Schroeder, 1982). Качественные и количественные отличия белков опорно-сократительного цитоскелетного комплекса кортикального слоя яйца, возникающие в ходе раннего

дробления, могут быть существенными в *детерминации последующей* морфогенетической подвижности клеток на вегетативном полюсе зародыша *морского ежа*.

Контактно-зависимая поляризация бластомеров мыши осуществляется с 8-бластомерной стадии развития как интегральная клеточная реакция, вовлекающая асимметризацию распределения микроворсинок, некоторых мембранных рецепторов, липидных компонентов мембраны, клеточных органоидов, *миозина, актина, спектрина* (Sobel, 1984; Sobel, Alliegro, 1985; Johnson, Maro, 1985; Reima, Lehtonen, 1985; Fleming et al., 1986a; Johnson et al., 1988; Sobel et al., 1988). Поляризованные бластомеры затем претерпевают асимметричное деление, давая начало двум клеточным линиям, различающимся своей судьбой в развитии (клетки внезародышевой трофэктодермы и клетки собственно зародыша). *В* процессе становления полярности бластомеров мыши и цитохалазин, и антимикротрубочковые вещества нарушают поляризацию, но после детерминации осевой полярности оказываются малоэффективными (Johnson, Maro, 1985; Fleming et al., 1986b).

Таким образом, возникающая в ходе дробления поляризация бластомеров весьма стабильна, как это показано на зародышах морского ежа и мыши, т.е. ранние бластомеры, подобно яйцу, обладают долговременной памятью (см. гл. VI).

Помимо контактно-обусловленных перестроек комплекса *мембрана*–цитоскелет, сопровождаемых асимметризацией распределения компонентов эндоплазмы и векторизацией процессов внутриклеточного транспорта, обнаружен перенос между бластомерами ранних зародышей введенного путем микроинъекции в один из них флюоресцирующего *красителя, а также электрическая* связь между бластомерами, выявляемая микроэлектродной техникой. Пространственно-временные паттерны межбластомерных связей такого рода *различны в ходе дробления разных* животных, но они свидетельствуют о возможности переноса какого-либо сигнального вещества от бластомера к бластомеру путем диффузии или активного транспорта. Перенос крупных молекул-меток между бластомерами ограничен очень небольшими группами клеток, возможно сохранившими межклеточные *мостики после* деления (Goodall, Johnson, 1984; Sanger et al., 1985); поэтому синцитиальные связи бластомеров вряд ли играют большую роль в передаче сигнальных *молекул. Такую функцию* могут выполнять специализированные межклеточные контактные зоны, ответственные за перенос относительно малых молекул.

Межбластомерные взаимодействия оказываются существенными не только при развитии регулятивного типа (например, у морского ежа – см.: Buznikov, 1984), но и в ходе *так* называемого мозаичного развития: у моллюсков (Martindale et al., 1985; Biggelaar, 1986; Serras, Speksnijder, 1990; Serras et al., 1990), асцидий (Serras et al., 1988) *и даже аннелид* (Schierenberg, 1987), выполняя важные морфогенетические функции, в частности определяя дорсовентральную полярность зародышей некоторых моллюсков. *Дорсовентральность* эмбриона морского ежа тоже детерминируется в ходе раннего дробления, а именно первых пяти делений (Kominami, 1988; Cameron et al., 1989; Cameron et al., 1990).

Полная или частичная изоляция бластомеров морского ежа S. nudus в результате обработки папаином (0,3% в течение 10 мин начиная через 2 мин после осеменения) дает возможность воздействия на становление дорсовентральной оси зародыша, а также на трансляцию анимально-вегетативной полярности яйца в основную ось зародыша.

Обработка осемененных яиц S. nudus папаином приводит к отсутствию оболочки оплодотворения и редукции гиалиновой оболочки; возможна *как полная, так и частичная изоляция каждого из двух первых бластомеров* (рис. 47, *а*). Расположение микромеров – маркеров вегетативного полюса зародышей – свидетельствует о степени разобщения двух групп бластомеров – производных каждого из двух первых бластомеров (рис. 47, *б, в*).

Результат полной изоляции первых двух бластомеров и их производных – развитие из каждого яйца двух зародышей-двойников половинного размера (рис. 48, *а*). Такой итог дробления обработанных папаином яиц становится очевидным на стадии эпителизации бластулы, когда обе группы клеток – производных первых двух бластомеров – превращаются в бластулы вдвое меньшего размера, чем обычный. В случае неполной изоляции двух групп бластомеров половинные зародыши оказываются *соединенными* (рис. 48, *б*), *причем чаще всего вегетативными полюсами*, что становится ясным в ходе дальнейшего развития: такие зародыши обычно становятся двойниковыми экзогаструлами, соединенными общим экзоархентероном (рис. 48, *в*). Наконец, изредка встречались зародыши нормального размера, однако с двумя архентеронами, локализованными либо на разных полюсах зародыша (рис. 49, *а*), либо рядом на одном и том же полюсе (рис. 49, *б*).

У обработанных папаином и сохранивших нормальный анимально-вегетативный паттерн зародышей практически во всех случаях оказалась подавленной экспрессия дорсовентральной (орально-аборальной) оси. В то время как контрольные зародыши достигли стадии призмы с ясно выраженной орально-аборальной полярностью (рис. 50, *а*), все обработанные зародыши были радиально-симметричными (рис. 50, *б*). При полной радиализации архентерон был направлен от вегетативного полюса к *анимальному, т.е. орально-аборальная ось полностью* совпадала с анимально-вегетативной, и никаких черт билатеральной организации зародыша не возникало. Расположение клеток первичной мезенхимы и паттерн продуцируемых ими спикул личиночного скелета также оказывались радиализированы (см. гл. III).

Внешние воздействия могут вызывать у зародышей морских ежей отклонения от нормального развития, определяемые как анимализация, *вегетализация и радиализация* (Lallier, 1966a, 1975; Gustafson, Wolpert, 1967; Hörstadius, 1973). Если анимализация и вегетализация проявляются в измененном соотношении экспрессии признаков анимального и вегетативного полюсов личинки при сохранении ранее детерминированной

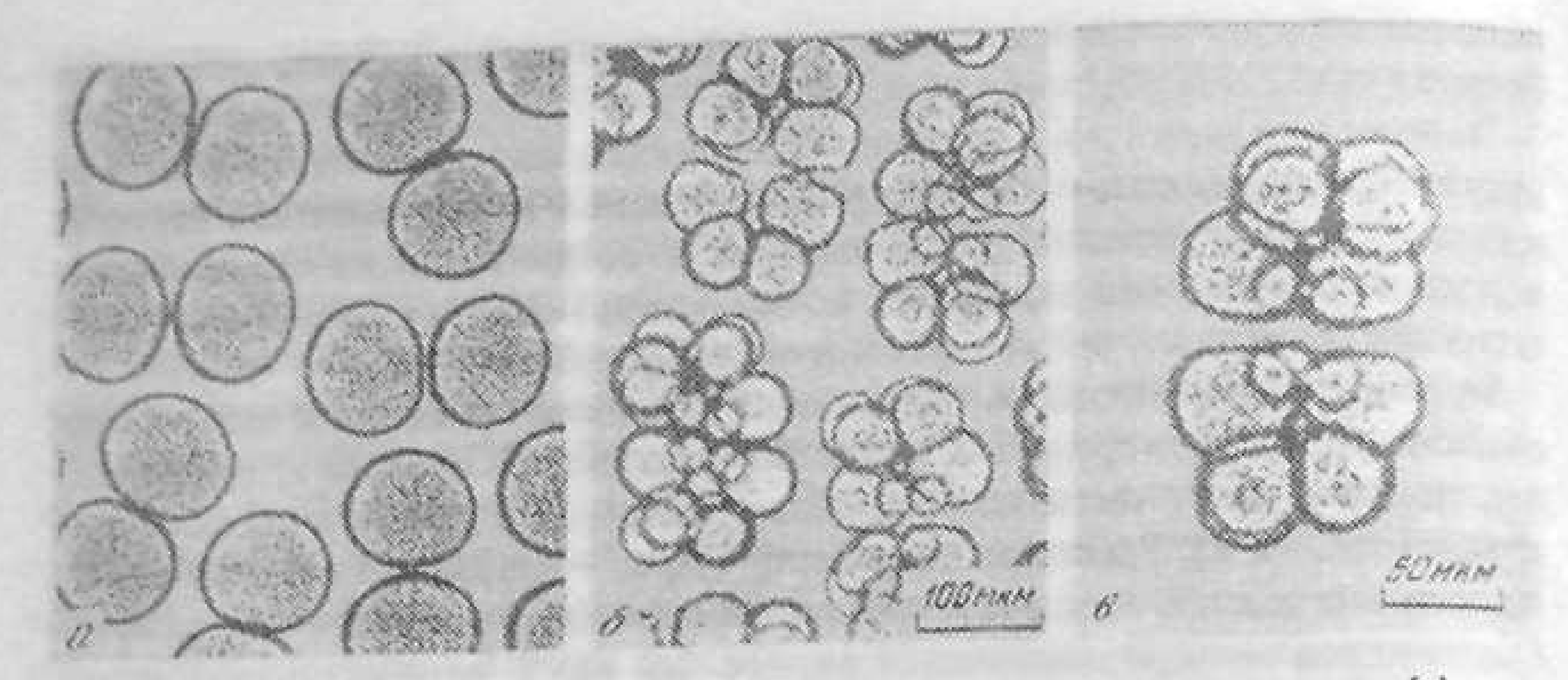


Рис. 47. Частичная или полная изоляция бластомеров после первого деления (*а*) и их производных после четвертого деления (*б*, *в*) при дроблении яиц S. nudus, обработанных папаином

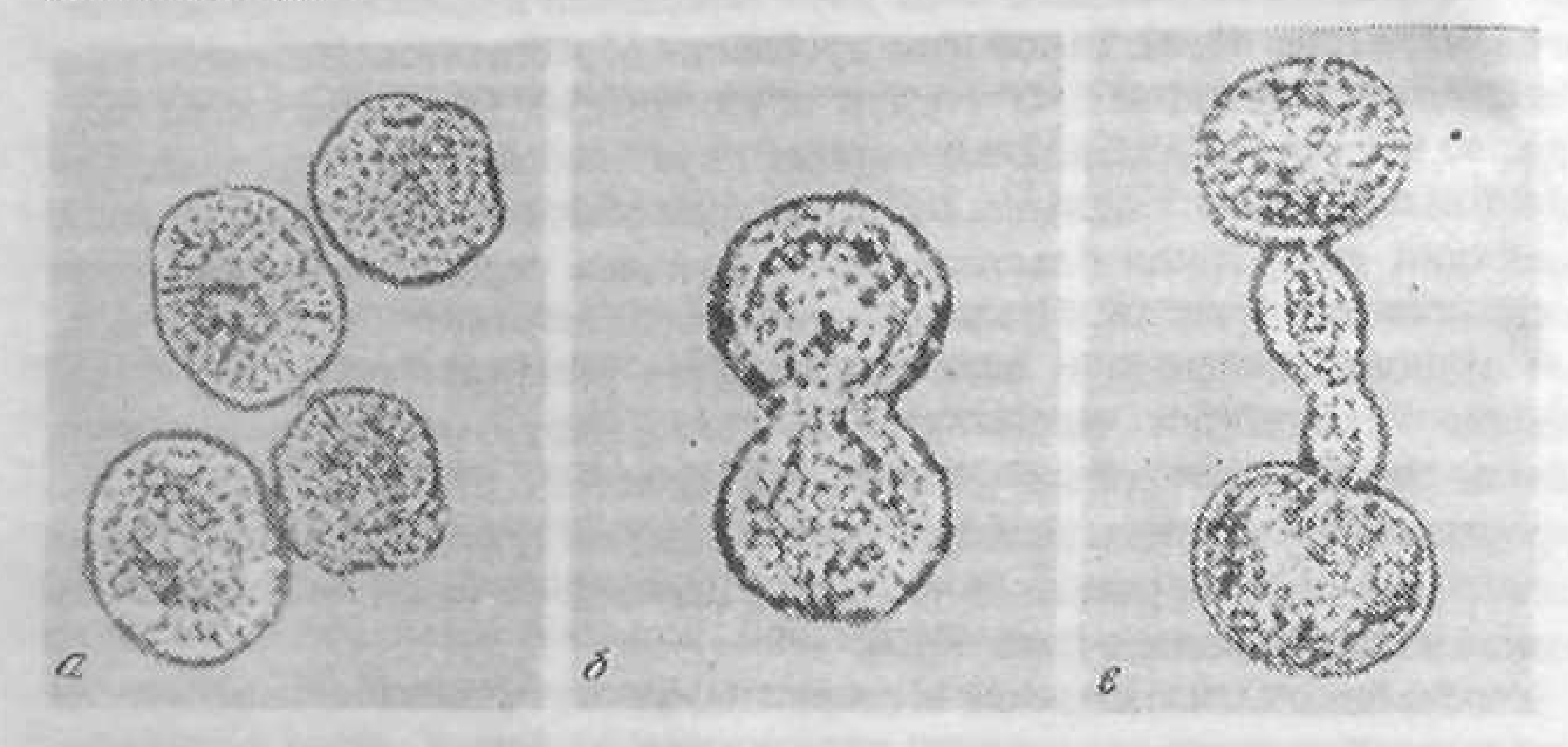


Рис. 48. Двойниковые зародыши, развившиеся из обработанных папаином яиц S. nudus

а — изолированные, *б* — соединенные бластулы-близнецы; *в* — близнецы, соединенные общим экзоархентероном

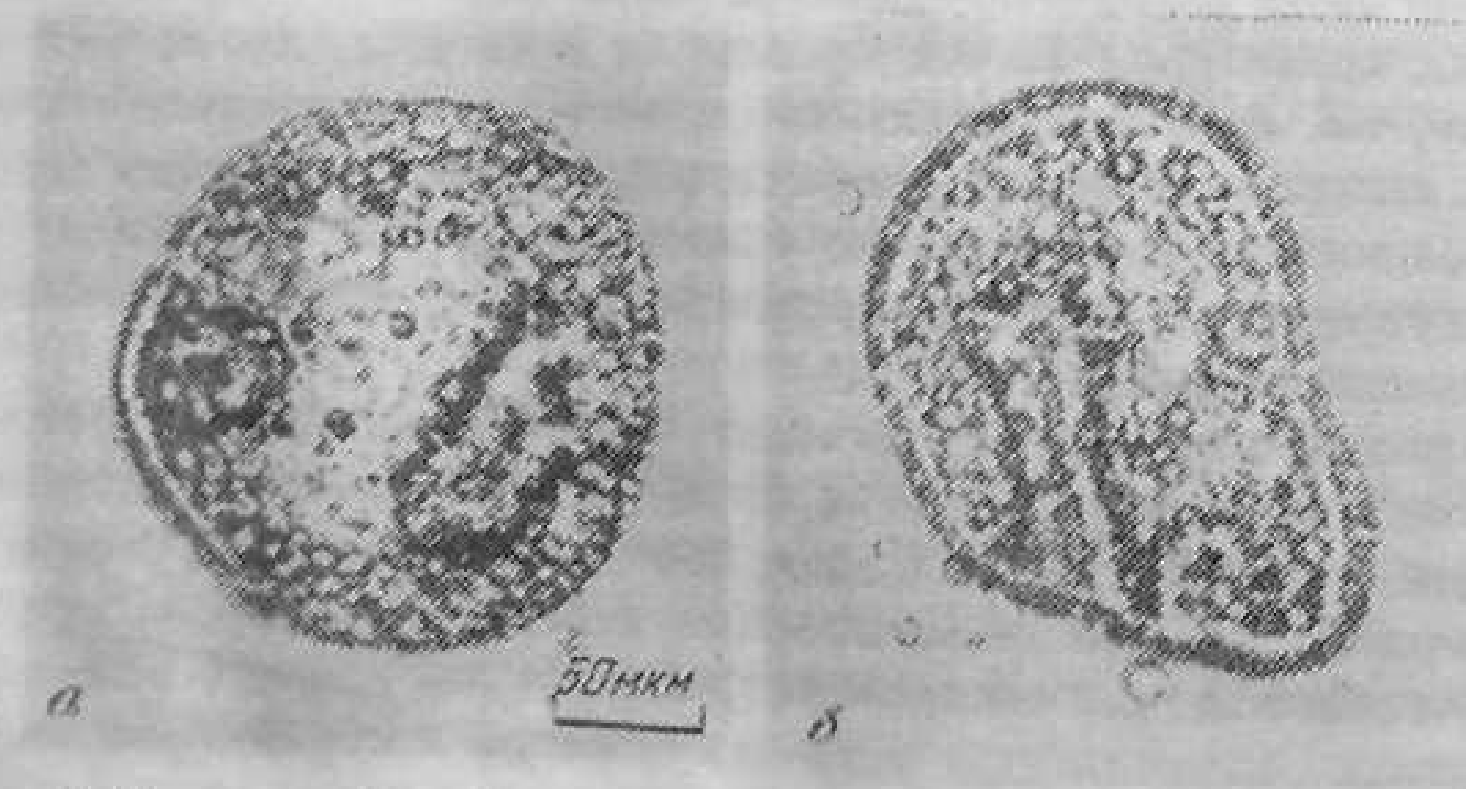


Рис. 49. Зародыши S. nudus с двумя архентеронами, развившиеся из обработанных папаином яиц

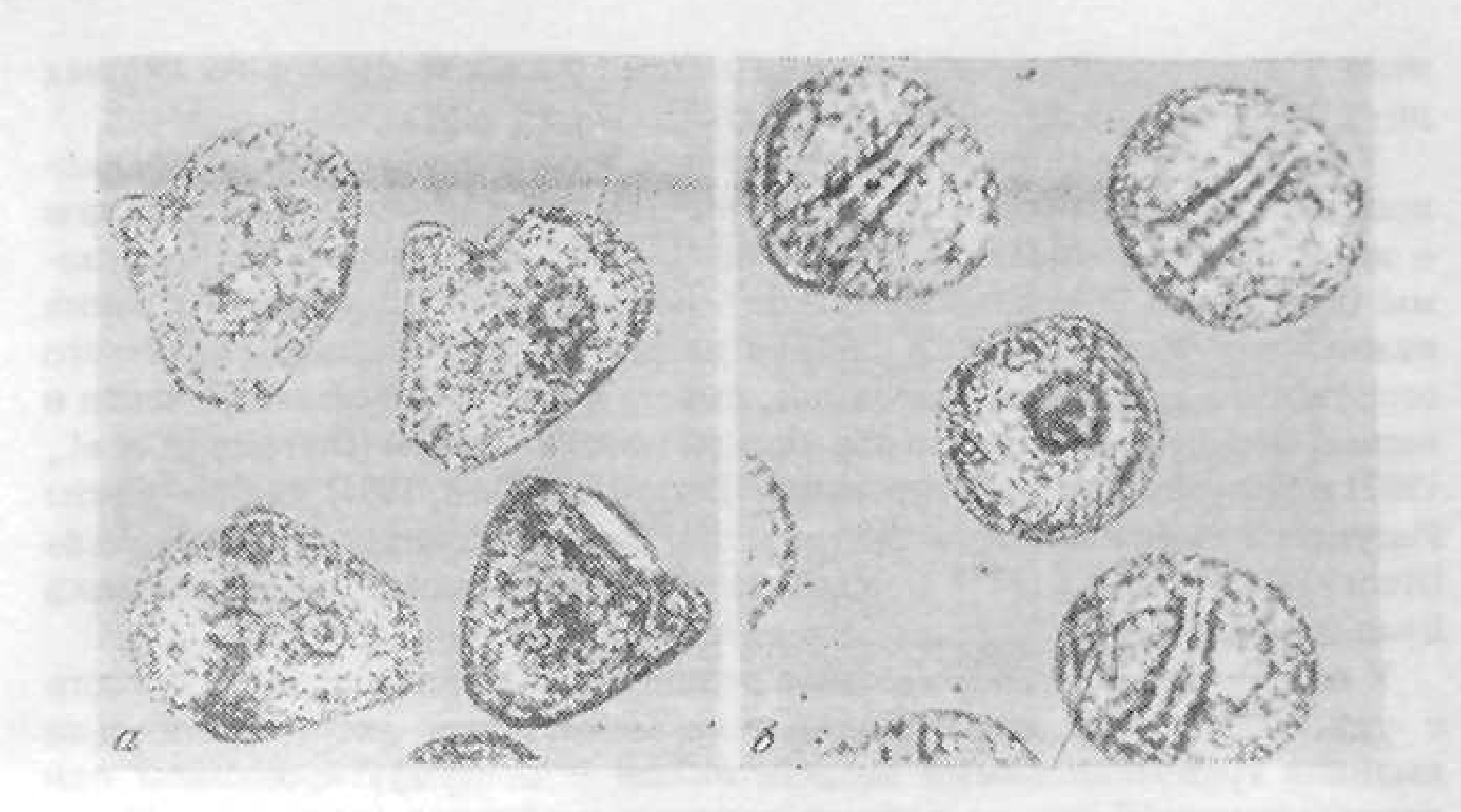


Рис. 50. Контрольные (*а*) и радиализированные в результате воздействия папаином *б* зародыши S. nudus

осевой полярности, то радиализация характеризуется отсутствием нормальной билатеральной симметрии и развитием радиально-симметричного зародыша. Хорошо известно, что так называемая регулятивность развития морского ежа проявляется, в частности, в возможности развития целой личинки уменьшенного размера из одного бластомера, изолированного после I или II деления дробления, хотя разрезание яйца еще до оплодотворения по экваториальной плоскости, как и III деление дробления, не оставляет возможности подобной регуляции: развитие личинки, к тому же с явными признаками вегетализации, может обеспечить лишь вегетативная половина яйца или вегетативный квартет бластомеров (Hörstadius, 1973; Maruyama et al., 1985).

Каждый из первых двух бластомеров зародыша иглокожих оказывается носителем анимально-вегетативной оси, морфологически и функционально поляризованным (Schroeder, 1988; Kuraishi, Osanai, 1989). Полная или частичная изоляция первых двух бластомеров, каждый из которых несет полноценный осевой набор морфогенетических детерминантов, при смещении оси одного из бластомеров относительно оси другого может вести к возникновению зародышей-двойников с двумя основными осями, расположенными под разным углом, что и было обнаружено после обработки яиц S. nudus папаином. Независимое развитие каждого из первых двух изолированных бластомеров морского ежа дает в результате двойников половинного размера, что наблюдалось и после других воздействий (Vacquier, Mazia, 1968; Buznikov, Shmukler, 1981; Johnson et al., 1989; см. также: Hörstadius, 1973). Если же взаимное смещение анимально-вегетативных осей каждого из двух бластомеров сочетается с их дальнейшим развитием в составе единого зародыша, возникают два архентерона. Удвоение такого рода (duplicitas posterior) было экспериментально полу-

чено у зародышей морской звезды путем поворота одного из первых двух бластомеров (Kuraishi, Osanai, 1989).

У животных со спиральным мозаичным дроблением механизм возникновения подобных удвоений (duplicitas cruciata) – сращенных близнецов – иной: равное распределение при первом делении материала телоплазмы (квадранта D полярной лопасти), необходимого для формирования важнейших личиночных и дефинитивных структур и организующего осевую симметрию всего зародыша, вместо неравного, асимметричного в норме. Это было достигнуто обработкой цитохалазином (Dorresteijn et al., 1987) или путем центрифугирования (Dorresteijn, Eich, 1991) яиц полихеты Platynereis, механическим сжатием яиц другой полихеты, Chaetopterus (Henry, Martindale, 1987) и обработкой цитохалазином яиц моллюска Ilyanassa (Render, 1989) до первого деления дробления.

У шпорцевой лягушки массовое возникновение близнецовых уродств с удвоенным передним концом тела может быть экспериментально вызвано гравитационными воздействиями – центрифугированием или переориентацией яиц до первого деления дробления (например: Black, Gerhart, 1986; Cooke, 1987; Kunieda, Wakahara, 1987).

Если развитие сращенных уродливых двойников у представителей аннелид, моллюсков и амфибий связано с нарушениями становления дорсовентральной полярности, то возникновение близнецов у морского ежа обусловлено нарушением трансляции анимально-вегетативной оси в результате изоляции первых двух бластомеров, каждый из которых унаследовал качественно полноценный набор детерминантов анимально-вегетативной полярности. Поскольку становление дорсовентральной (орально-аборальной) полярности зародышей морского ежа определяется взаимодействиями бластомеров в ходе раннего дробления, обработка папаином яиц до начала дробления, приводящая к нарушению межбластомерных связей, оказалась очень эффективной, вызывающей практически 100%-ную радиализацию.

Так как сегрегация морфогенетического потенциала зиготы морского ежа при первом делении дробления проявляется в раздроблении надвое анимально-вегетативного осевого паттерна, временным носителем которого оказывается каждый из первых двух бластомеров, их полная изоляция друг от друга приводит к развитию нормальных зародышей половинного размера. После обработки папаином в некоторых опытах 25–40% яиц S. nudus развивались как изолированные двойники, превращаясь затем в нормальных внешне плутеусов половинного размера. Показано (Hinegardner, 1975), что подобные близнецы морского ежа способны к метаморфозу и развитию в половозрелых ежей. Неполная же изоляция бластомеров при нарушении их нормального взаимодействия может вызвать аномальное развитие двух архентеронов, т.е. удвоение осевого паттерна. Возможно, подобный механизм объясняет возникновение дупликаций у метаморфизирующих личиное Arbacia punctulata после обработки зигот проназой (Marcus, 1981).

Целостность анимально-вегетативного паттерна дробящегося яйца морского ежа восстанавливается на стадии средней бластулы. Именно на

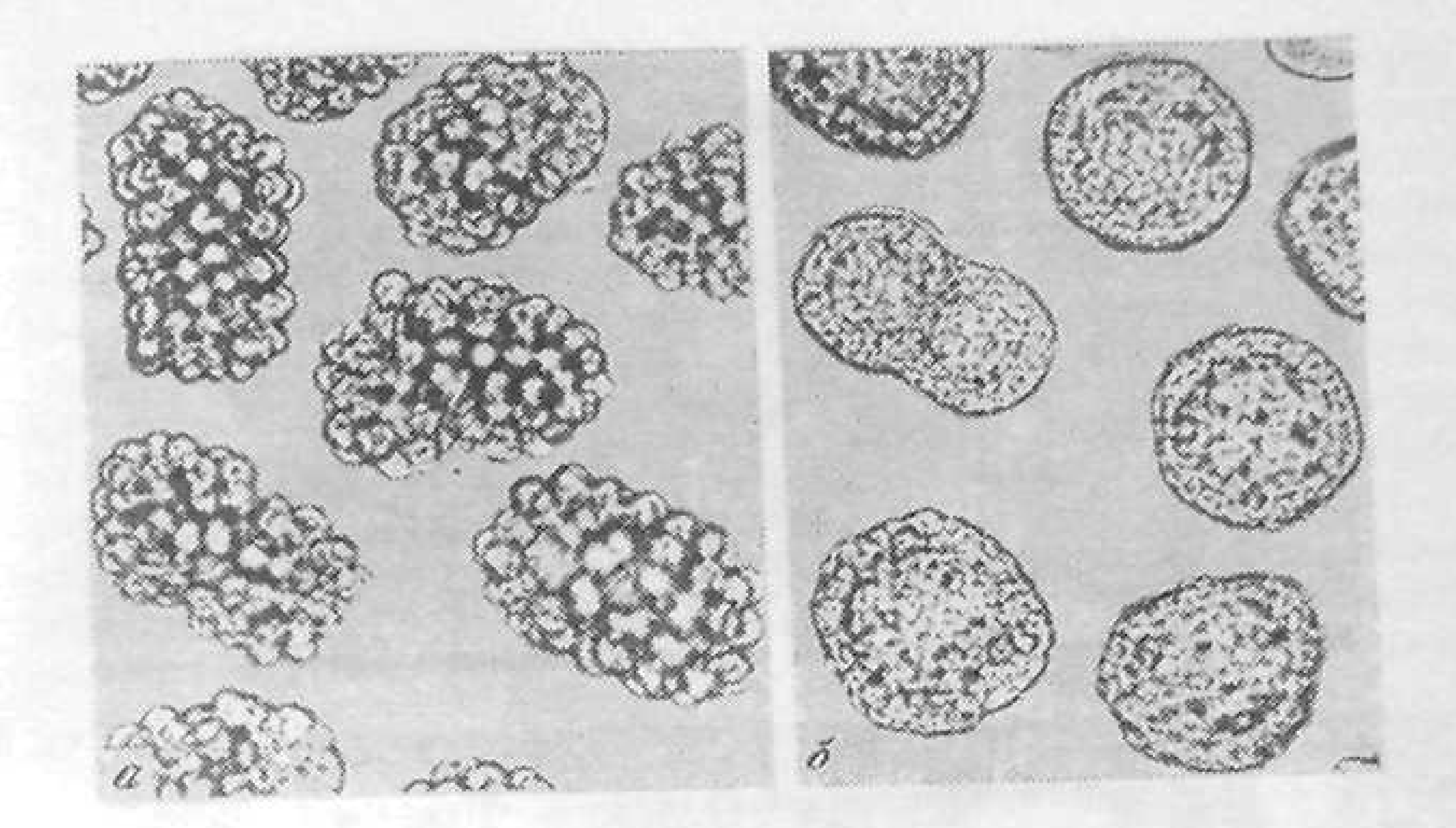


Рис. 51. Переход от ранней (*а*) к средней (*б*) бластуле зародышей S. nudus (обработка папаином)

этой стадии происходит регуляция формы зародышей с измененной различными экспериментальными воздействиями пространственной организацией бластомеров. Пространственная организация дробления нарушалась, в частности, после обработки яиц папаином, и к стадии ранней бластулы зародыши имели уплощенную форму с неправильными очертаниями (рис. 51, *а*). При переходе к средней бластуле (стадии 9–10; по: Бузников, Подмарев, 1975) осуществлялась типичная для зародышей морских ежей эпителизация стенки бластулы. Сферическая форма бластомеров преобразовалась в многогранную с увеличением протяженности зон межбластомерных контактов, т.е. плотной упаковкой клеток в эпителиальный пласт стенки бластулы, с возникновением гладких поверхностей (наружной и внутренней) клеточного пласта (рис. 51, *б*). При этом и весь зародыш, как правило, приобретал сферическую форму (за исключением рассмотренных уже случаев развития двойниковых зародышей).

Такой же процесс эпителизации стенки бластулы с регуляцией формы зародыша происходил при развитии яиц S. nudus, деформированных механическими воздействиями, и у обработанных додецилсульфатом натрия зародышей Scaphechinus mirabilis (Божкова, Исаева, 1984). Обработанные додецилсульфатом натрия зародыши дробились синхронно с контрольными, но отчетливо отличались от последних по пространственному расположению бластомеров рыхлыми группировками с неопределенными, неправильными очертаниями. На стадии средней бластулы зародыши в растворе додецилсульфата временно становились более компактными, приближаясь по форме зародыша к норме, но вскоре вновь разрыхлялись вплоть до полной дезагрегации клеток. Зародыши,

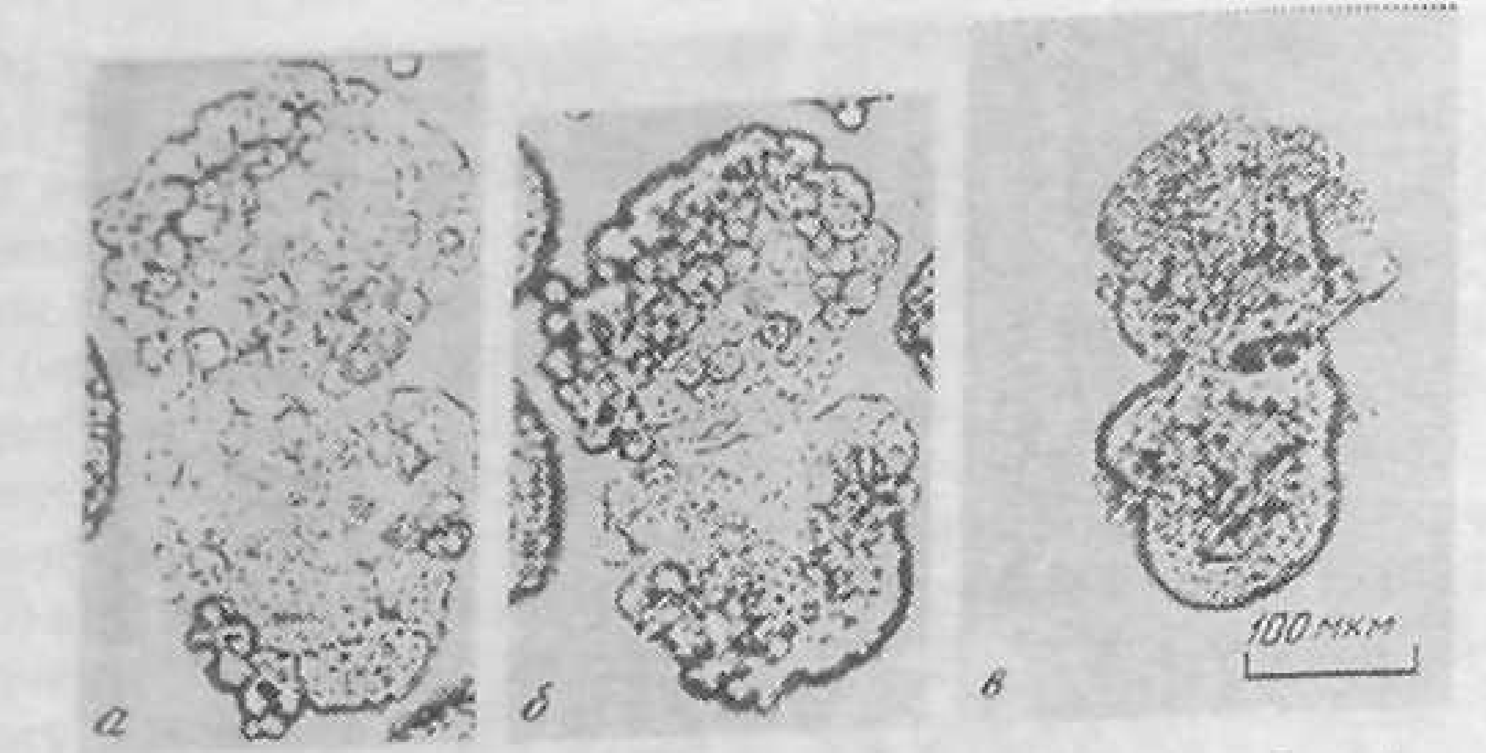


Рис. 52. Бластуляция однослойной пластинки бластомеров S. nudus

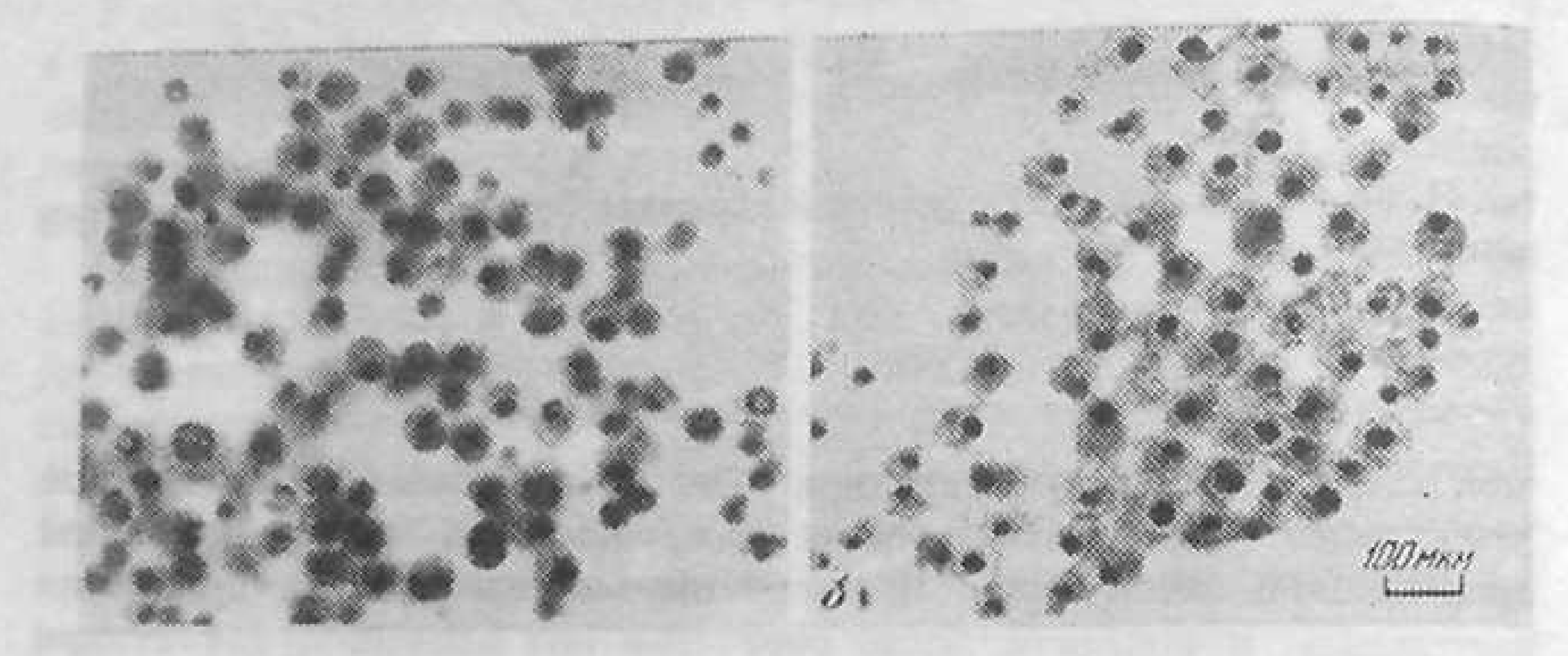


Рис. 53. Образование эпителиального слоя бластомерами S. nudus in vitro:
а — бластомеры вскоре после диссоциации; *б* — установление межклеточных контактов

отмытые от додецилсульфата натрия, претерпевали эпителизацию стенки бластулы, хотя весь зародыш при этом редко приобретал правильную сферическую форму (Божкова, Исаева, 1984).

Яйца S. nudus после обработки папаином иногда дробятся с образованием одного слоя бластомеров, лежащих на дне чашки Петри. В период, соответствующий стадии эпителизации бластулы, бластомеры смыкаются в плотную однослойную пластинку с полигональными очертаниями бластомеров. Края такой пластинки начинают изгибаться вверх (рис. 52, *а, б*); несколько позже реконструирующийся таким образом зародыш с еще не замкнутыми краями пласта (рис. 52, *в*) становится подвижным.

После полной диссоциации зародышей S. nudus стадии средней бластулы на отдельные клетки (Исаева, 1980а) округлившиеся и потерявшие связи друг с другом бластомеры (рис. 53, *а*) в течение нескольких часов (при культивировании в морской воде с добавлением сыворотки) восстанавливают межклеточные контакты и образуют эпителиальный слой на дне чашки с характерной полигональной морфологией связанных друг с другом клеток (рис. 53, *б*).

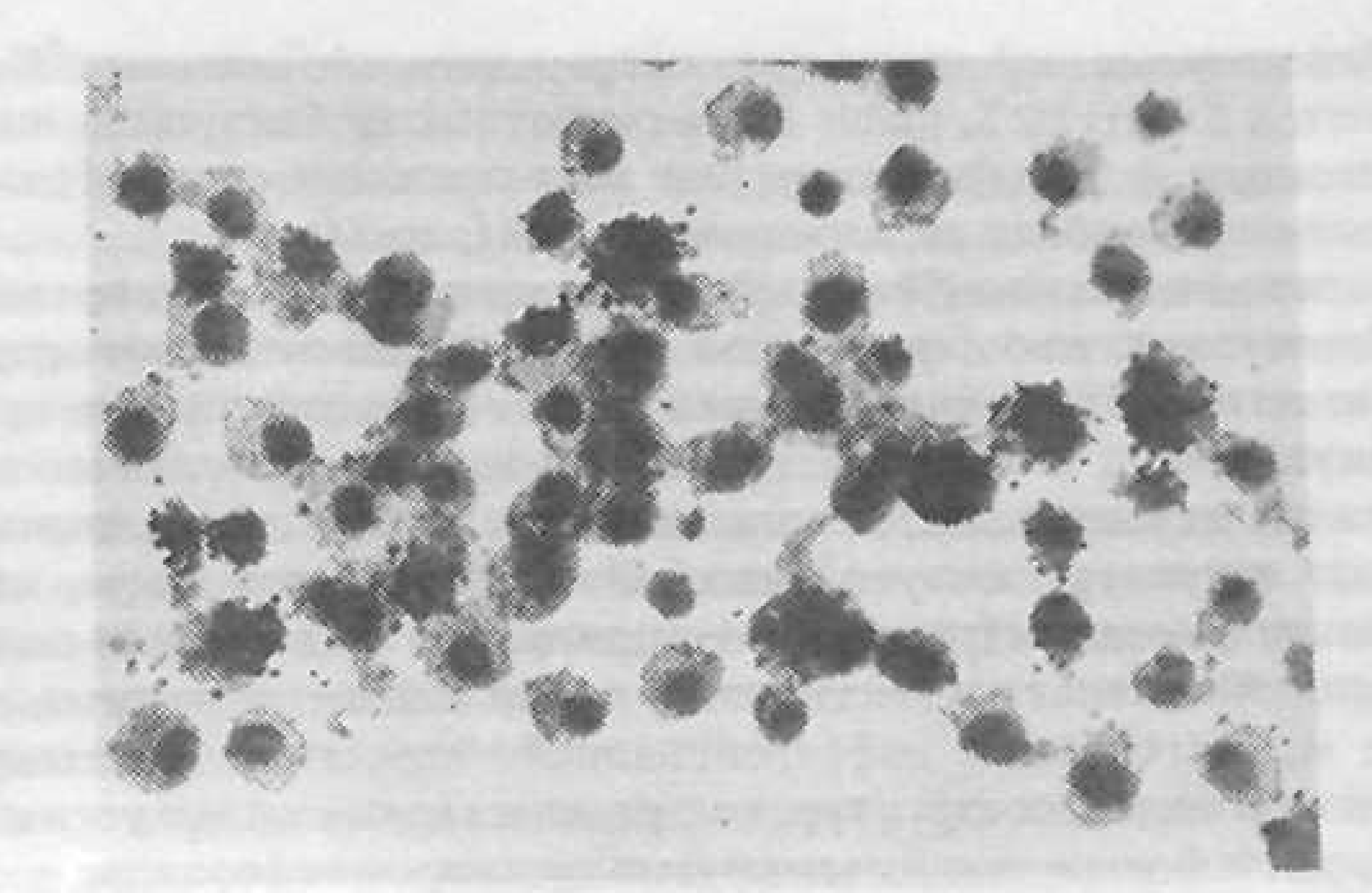


Рис. 54. Установление контактов между бластомерами двух видов морских ежей (меченые клетки S. nudus, немеченые — S. intermedius)

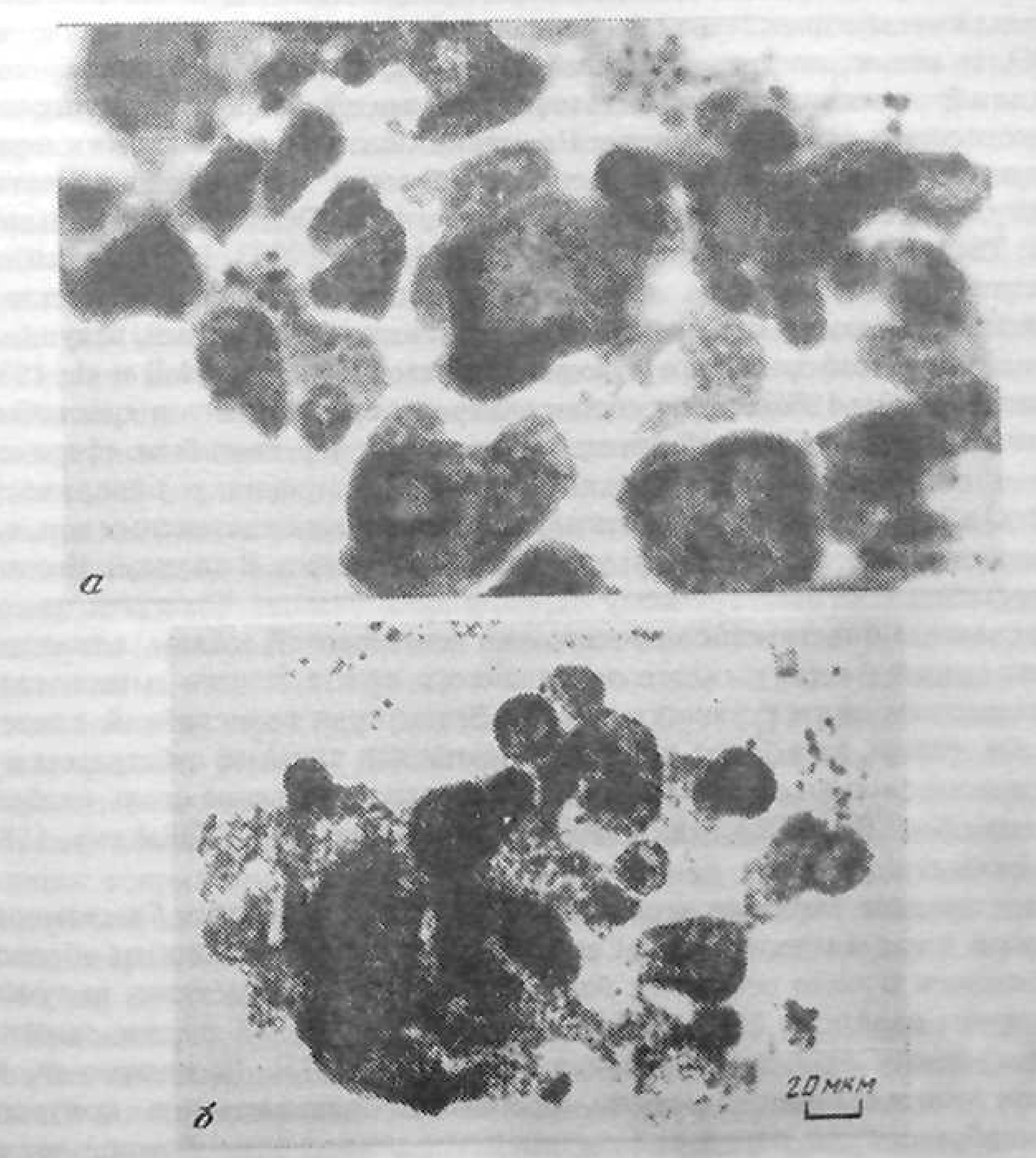


Рис. 55. Эпителиальные морфогенезы в культуре эмбриональных клеток S. nudus

При совместном культивировании предварительно меченных ^{3}Н-тимидином клеток бластулы S. nudus и немеченых клеток бластулы S. intermedius бластомеры формируют химерные эпителиальные слои, образованные смесью клеток обоих видов морских ежей (рис. 54).

При более длительном (24–48 ч) культивировании диссоциированных клеток бластулы S. nudus в морской воде с добавлением сыворотки и антибиотиков наряду с формированием плавающих реагрегатов и процессами спикулогенеза in vitro (см. гл. III) в массе прикрепленных к дну чашки клеток осуществляются эпителиальные морфогенезы: возникают трехмерные структуры полусферической и сферической форм, иногда расчлененные на отделы (рис. 55). По-видимому, в этих случаях вслед за "бластуляцией" in vitro осуществляется и дальнейшая программа эпителиальных морфогенезов с дифференциацией экто-, энто- и мезодермальных эпителиальных структур, как распластанных на искусственном субстрате, так и формирующих замкнутые трехмерные сфероиды.

Если для поддержания целостности зародыша морского ежа в раннем дроблении оказываются существенными поверхность и кортикальный слой зиготы вместе с внеклеточной оболочкой (Wolpert, Mercer, 1963; Schroeder, 1986), то позже, на стадии средней бластулы, происходит переключение на иной механизм межклеточных взаимодействий, определяющий целостность и форму зародыша. На стадии бластулы у иглокожих появляются специализированные контактные зоны, связывающие клетки бластулы в единый пласт (Wolpert, Mercer, 1963; Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980; Turner, 1980; Kadokawa, 1983; Spiegel, Howard, 1983, 1985). Взаимная адгезия клеток бластулы морского ежа опосредуется специфическими гликопротеиновыми комплексами поверхности – топосомами, несущими позиционную информацию о положении клеток в системе (Noll et al., 1985; Matranga et al., 1986). Зоны специализированных контактов связывают клетки бластулы в единый пласт; форма клеток перестает быть сферической и становится многоугольной (при рассмотрении с поверхности пласта) за счет увеличения протяженности линейных контактных зон, т.е. происходит переход от рыхлой упаковки бластомеров к плотной. Именно ко времени, соответствующему периоду эпителизации бластулы, диссоциированные бластомеры морского ежа или морской звезды, лежавшие на дне чашек в виде рыхлого однослойного пласта, плотно смыкаются с образованием эпителиального пласта. Затем края однослойной клеточной пластинки, изгибаясь, приподнимаются над плоским субстратом и в конце концов смыкаются, завершая бластулообразование столь необычным способом (Dan-Sohkawa, Fujisawa, 1980; Turner, 1980; Kadokawa, 1983; Kadokawa et al., 1986).

Этот процесс наиболее исследован на диссоциированных бластомерах морской звезды и назван Дан-Сокавой бластуляцией. Сходным образом дробящиеся в виде открытых полусфер половинки бластулы, полученные путем изоляции бластомеров на двухбластомерной стадии, замыкаются к концу дробления в сферу (Hörstadius, 1973). По-видимому, на стадии эпителизации бластулы происходит переключение контроля формообразования, передача функции контроля над формой зародыша от преформированной кортикальной поверхности (в комплексе с яйцевыми оболочками) к клеточным контактам.

Такой же способ бластуляции – путем изгибания, инкурвации эпителизованного клеточного слоя – наблюдался иногда при развитии обработанных папаином яиц морского ежа. Это типичный случай эпителиального морфогенеза (см. гл. VI), хотя подобные морфогенетические изменения геометрической формы и топологические перестройки клеточных пластов в ходе нормального развития осуществляются позже (инвагинация архентерона, образование целомов и т.п. – см. Преснов, Исаева, 1985). Обычное же проявление "бластуляции" в ходе развития приводит к эпителизации стенки бластулы и регуляции формы зародышей после различных экспериментальных воздействий, изменяющих пространственную организацию дробления.

При культивировании диссоциированных бластомеров морского ежа в течение двух суток в однослойной фазе наблюдаются более разнообразные эпителиальные морфогенезы, приводящие к формированию полусферических или пузыревидных структур, сходных как с эктодермальными, так и с энтодермальными эпителиями зародыша. Такого рода образования ранее были найдены в культурах клеток морского ежа (Spiegel, Spiegel, 1975, 1986). В процессе реагрегации смеси клеток двух видов морских ежей происходит в конечном итоге видоспецифичная рассортировка клеток, но на начальных стадиях в стационарных культурах возможны ассоциации клеток разных видов (Giudice, Mutolo, 1970; McClay, Hausman, 1975; Spiegel, Spiegel, 1975, 1986; Schneider, 1985). При совместном культивировании диссоциированных клеток бластул S. nudus и S. intermedius начальный процесс эпителизации однослойной фазы вовлекает клетки независимо от их видовой принадлежности.

Это переключение на иной механизм межклеточных взаимодействий с появлением специализированных контактных зон совершается у представителей различных классов иглокожих, когда зародыш после серии синхронных делений дробления состоит из 128–256 клеток (Holland, 1981, и ссылки выше). Подобное переключение в развитии амфибий (исследованое главным образом на Xenopus) осуществляется тоже на стадии средней бластулы (однако образованной примерно из 4000 клеток) как координированный глобальный переход к асинхронным митотическим циклам с изменением их структуры (появлением фаз G_1 и G_2) и резкой активацией транскрипции (Newport, Kirschner, 1982; Kirschner et al., 1985); этот же переход включает эпителизацию клеток бластулы. У млекопитающих (мыши) компактизация зародыша и эпителизация наружного слоя его клеток сопряжены с детерминацией клеточной линии будущей трофэктодермы и совершаются после асимметричного деления поляризованных бластомеров 8-клеточного зародыша, на 16-клеточной стадии (Levy et al., 1986; см. также ссылки выше).

При всех различиях такого перехода, перелома в развитии животных разных таксономических групп, общность и глобальность событий заключается в координированности изменений морфофункциональной организации клеток зародыша, десинхронизации ранее синхронных делений

дробления и превращении бластомеров в клетки интегрированного эпителиального пласта. Такого рода координированный, "фазовый" переход в развитии различных животных уже давно был охарактеризован *П.П. Ивановым* (1937) как переход от цитотипического периода к органотипическому, и современные данные подтверждают и углубляют это обобщение.

По-прежнему остаются неясными механизмы, лежащие в основе регулятивных способностей отдельных бластомеров и зародыша в целом. Инвариантность характера нормального дробления объясняет постоянство пространственной локализации клеточных линий зародыша, однако у морского ежа, например, даже весьма существенные нарушения нормальной пространственной организации дробления оказываются регулируемыми, допуская развитие нормальной личинки. Более того, способные к метаморфозу в половозрелых ежей личинки могут развиваться и из бластомеров, диссоциированных на 16-клеточной стадии и затем реагрегировавших (Hinegardner, 1975). Замечательный синтез данных классической экспериментальной эмбриологии и современных результатов молекулярно-биологических исследований осуществляется Дэвидсоном: возможность эмбриональных регуляций, как и нормальная детерминация судьбы бластомеров морского ежа, обеспечивается индукционными межбластомерными взаимодействиями, определяющими связывание специфических белков с регуляторными сайтами ДНК (Davidson, 1989).

Итак, дробление зиготы осуществляет важнейшие морфогенетические функции. Цитоскелет зиготы, играя существенную роль в пространственной организации дробления, выполняет морфогенетическую функцию стабилизации после оплодотворения и распределения по бластомерам в ходе дробления кортикальной и ооплазматической гетерогенности. Помимо функции воссоздания многоклеточности и распределения гетерогенности ооплазмы–оолеммы, дробление яйца с необходимостью создает дополнительную анизотропию комплекса цитоскелет–плазматическая мембрана в пределах каждого бластомера – как за счет различий предсуществовавшей и возникающей вновь в ходе дробления поверхности, так и за счет поляризации бластомеров, определяемой их контактными взаимодействиями. Межбластомерные взаимодействия детерминируют дорсовентральную полярность в ходе раннего дробления иглокожих и некоторых других групп животных. На стадии средней бластулы у иглокожих происходит переключение на иной механизм межклеточных взаимодействий, определяющий целостность и форму зародыша: происходит регуляция формы зародышей с измененной пространственной организацией бластомеров, восстанавливается целостность осевого анимально-вегетативного паттерна путем надклеточной интеграции (эпителизации) клеток зародыша. *Переход к новому, гистоспецифичному* характеру межклеточных взаимодействий наглядно проявляется при "бластуляции" слоя бластомеров in vitro – типичном эпителиальном морфогенезе.

Глава III
МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПЕРЕМЕЩЕНИЯ КЛЕТОК И ЦИТОДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ В ХОДЕ *ЛИЧИНОЧНОГО СПИКУЛОГЕНЕЗА МОРСКОГО ЕЖА*

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ СПИКУЛОГЕНЕЗА И ЕЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДИФИКАЦИИ IN VIVO

Период дробления зиготы с детерминацией клеточных линий зародыша сменяется периодом морфогенетических перемещений клеток. Морфогенетические перемещения клеток в ходе развития разрушают прежние и создают новые ассоциации клеток, что зависит от изменений адгезивности клеточной поверхности и селективной адгезии клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс. Исследования специфических молекул клеточной адгезии (гликопротеинов поверхности) в ходе развития привели Дж. Эделмена к формулировке теории о пространственно-временном расписании экспрессии этих гликопротеинов как молекулярной основе морфогенеза (Edelman, 1984, 1985a,b; 1991). Морфогенетические клеточные движения (см.: Trinkaus, 1969, 1984; Deuchar, 1975) реализуются как миграция клеток поодиночке (хорошо известные примеры: миграция первичных половых клеток, клеток нервного гребня, нейробластов у позвоночных) либо как эпителиальные морфогенезы посредством координированного в пространстве и времени функционирования интегрального цитоскелета – гистоскелета (см. гл. VI). Один из примеров эпителиального морфогенеза – бластуляция слоя бластомеров in vitro – рассмотрен в гл. II. Значительно более известный пример раннего эпителиального морфогенеза – инвагинация архентерона у иглокожих и гаструляция подобного типа в развитии других животных.

Однако инвагинация архентерона предваряется у морских ежей иммиграцией на вегетативном полюсе клеток первичной мезенхимы, производных микромеров. Уже на 16-клеточной стадии развития микромеры – *носители программы спикулогенеза, реализуемой и в условиях их изоляции* (Okazaki, 1975a). На этой же стадии на поверхности микромеров найдены специфические белки, отсутствующие у макро- и мезомеров (Simons, Fuller, 1985). В ходе дальнейшего дробления производные микромеров, как и все остальные клетки, входят в состав эпителиальной стенки бластулы и связаны с соседними клетками и друг с другом системой межклеточных контактов (Solursh, 1986; Spiegel, Spiegel, 1986). На стадии поздней (мезенхимной) бластулы клетки вегетативного полюса теряют фенотип эпителиальных клеток, становятся подвижными и выселяются в полость бластоцеля, мигрируя поодиночке по внутренней стенке бластулы. Миграция клеток первичной мезенхимы зависит от потери адгезивности этих клеток к соседним эпителиальным клеткам и к гиалиновому слою (наружному внеклеточному матриксу зародыша) с приобретением адгезивности к внеклеточному матриксу внутренней стенки бластоцеля, а именно к фибронектину базальной мембраны (Fink, McClay, 1985).

Линия скелетогенной мезенхимы выделяется очень рано в развитии морского ежа: микромеры отделяются при IV делении дробления, и V деление полностью сегрегирует эту линию клеток (Davidson, 1989). Линия скелетогенной мезенхимы дает единственный тип дифференцированных клеток с экспрессией уникального набора генов, из которых изучены кодирующие *специфические белки* гены SM 50 и msp 130 (Benson et al., 1987; Sucor et al., 1987; Livingston et al., 1991). Исследование паттерна генной экспрессии этой клеточной линии выявило раннюю, вскоре после ее сегрегации, активацию гена SM 50 (кодирующего белок матрикса спикул) и гена одного из цитоскелетных актинов; транскрипция других исследованных генов начинается позже, после ингрессии клеток первичной мезенхимы в бластоцель (см.: Davidson, 1989). Изолированные на 16-клеточной стадии микромеры способны к автономной экспрессии тканеспецифичных генов (Stephens et al., 1989), синтезу специфических белков (Matsuda et al., 1988; Shimizu et al., 1988; Benson et al., 1990) и в адекватных условиях in vitro к полной реализации программы ларвального спикулогенеза с образованием спикул (Okazaki, 1975a; Harkey, Whiteley, 1980; *Decker, Lennarz, 1988;* Kiyomoto, Tsukahara, 1991).

Ранняя детерминация и возможность автономной экспрессии специфической цитодиференцировки – явно "мозаичная" черта в регулятивном развитии большинства видов морских ежей, отличающая их от представителей других классов иглокожих. У представителя относительно примитивной группы цидароидных морских ежей Eucidaris tribuloides характерный для морских ежей паттерн дробления не вполне выражен, размер и число микромеров варьируют, иммиграция клеток первичной мезенхимы до инвагинации архентерона отсутствует, линия спикулогенной мезенхимы с меньшим числом клеток выделяется позже (Schroeder, 1981; Wray, McClay, 1988). Эволюционная модификация паттерна дробления с полной утратой неравного деления на макро- и микромеры найдена у морского ежа Heliocidaris erythrogramma *и связана с прямым развитием* и отсутствием планктонной личинки у этого вида (Wray, Raff, 1989) Таким образом, асимметричное IV деление вегетативного квартета бластомеров с отделением микромеров и ранней сегрегацией клеточной линии спикулогенной мезенхимы – эволюционная адаптация, обусловленная формированием личиночного скелета планктотрофного плутеуса типичных морских ежей.

Образование спикул личиночного скелета клетками первичной мезенхимы морского ежа – пример очень ранней клеточной специализации: на стадии мезенхимной бластулы клетки первичной мезенхимы мигрируют в бластоцель, на стадии ранней–средней гаструлы мезенхимные клетки выстраиваются кольцом вокруг основания архентерона и образуют два сгущения клеток – будущие центры *спикулогенеза – и уже* на стадии поздней гаструлы продуцируют пару спикул личиночного скелета (Okazaki, 1960, 1975b; Wolpert, Gustafson, 1961; Dubois, Chen, 1989).

Каждая спикула состоит из углекислого кальция (точнее, кальцита с примесью магнезита), проявляющего при поляризационном и рентгеноструктурном анализе свойства монокристалла с содержанием небольшого количества органических веществ (Okazaki et al., 1980; Emlet, 1982; Benson et al., 1986; Richardson et al., 1989). Минерализация в организме зародыша осуществляется как внутриклеточный процесс в специализированном участке цитоплазмы, возникающем в результате слияния отростков нескольких первичномезенхимных клеток с образованием расчлененного *спикулогенного синцития* (Okazaki, *1960, 1975; Wolpert, Gustafson,* 1961; Gibbins et al., 1969; Millonig, 1970; Schmekel, 1975; Karp, Solursh, 1985a).

Характерными особенностями скелетообразования у иглокожих являются мезенхимное (мезодермальное) происхождение скелетогенных клеток (что выделяет иглокожих среди беспозвоночных животных и сближает с позвоночными), внутриклеточное отложение минерального вещества скелета (что характерно лишь для губок и иглокожих) и монокристаллические свойства кальцита, составляющего скелетные элементы (Simkiss, 1976; Wilbur, 1976). Началу внутриклеточной кальцификации у морских ежей предшествуют детально исследованный процесс миграции клеток первичной мезенхимы (потомков микромеров) в полость бластоцеля (Amemiya, Akasaka, 1986; Ettenson, McClay, 1986; Solursch, 1986; Decker, Lennarz, 1988; Urben et al., 1988) и слияние отростков первичномезенхимных клеток зародыша (Gibbins et al., 1969; Millonig, 1970; Okazaki, 1975; Schmekel, 1975) с образованием скелетогенного синцития сложной пространственной архитектуры, упорядоченность которой в организме зародыша контролируется взаимодействием первичномезенхимных клеток с эпителиальными и с внеклеточным матриксом внутренней стенки бластоцеля (Okazaki, 1960, 1975;Wolpert, Gustafson, 1961; Solursch, 1986; Lane, Solursch, 1988; Amemiya, 1989).

Исследована ультраструктура многоядерных склероцитов взрослых ежей (Shimizu, Yamada, 1976) и эмбриональных первичномезенхимных синцитиев, особенно для ранних стадий их функционирования (Gibbins et al., 1969; Schmekel, 1975). Предполагается, что мелкие пузырьки, продуцируемые расположенными вблизи ядер комплексами Гольджи, перемещаются по цитоплазматическим тяжам в безъядерный участок цитоплазмы, где путем слияния этих пузырьков возникает крупная вакуоль, содержащая органический материал (матрикс спикулы), на котором осаждается кристаллизующийся кальцит (Okazaki, Inoué, 1976). Растущая внутри большой вакуоли спикула окружена органическим веществом – матриксом, локализованным между мембраной вакуоли и кристаллической частью спикулы (Millonig, 1970); органический матрикс спикулы содержит коллаген и гликопротеиды (Gould, Benson, 1978; Pucci-Minafra et al., 1980; Benson et al., 1986).

Огромная спикулогенная вакуоль окружена более мелкими вакуолями (Millonig, 1970), вероятно выполняющими транспортную функцию; не исключено, что отдельные вакуоли могут становиться дополнительными центрами кальцификации и роста новой закладки спикулы. Подобные вакуоли характерны также для склеробластов взрослых ежей (Shimizu, Yamada, 1976).

Поскольку закладка и рост кальцитной спикулы зародышевого скелета морского ежа осуществляются внутри синцития, образуемого путем

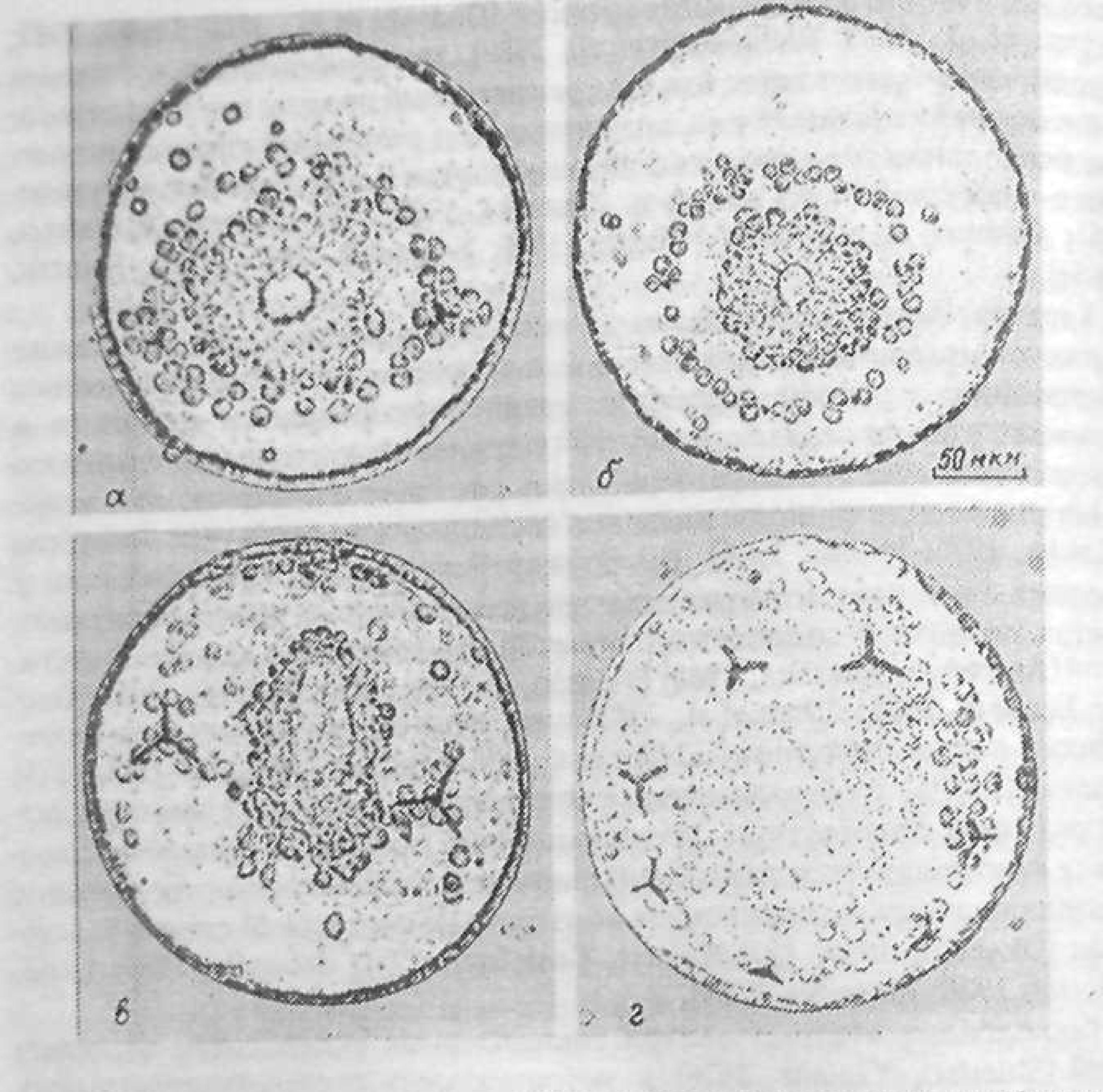


Рис. 56. Пространственная организация клеток первичной мезенхимы и образуемых ими спикул у нормальных (*а*, *в*) и радиализированных (*б*, *д*) зародышей S. nudus на стадии средней (*а*, *б*) и поздней (*в*, *г*) гаструлы

слияния (с исчезновением плазматической мембраны) отростков первичномезенхимных клеток, пространственное расположение первичномезенхимных клеток и образуемых ими синцитиев в бластоцеле зародыша определяет морфологию продуцируемых синцитиями спикул. Показано, что измененное распределение первичномезенхимных клеток приводит к изменению морфологии личиночного скелета (Prenant, 1926 a,b; Okazaki, 1962). С целью исследования зависимости морфологии личиночного скелета от пространственной архитектоники спикулогенных синцитиальных ансамблей была применена обработка папаином, вызывающая радиализацию зародышей морского ежа Strongylocentrotus nudus (Исаева, 1981а).

Массовое получение радиализированных зародышей дало возможность изучить не только относительно поздние этапы радиализации (с развитыми скелетными спикулами), но и более ранние проявления ее, выражающиеся в нарушении нормального распределения первичномезенхимных клеток в полости бластоцеля.

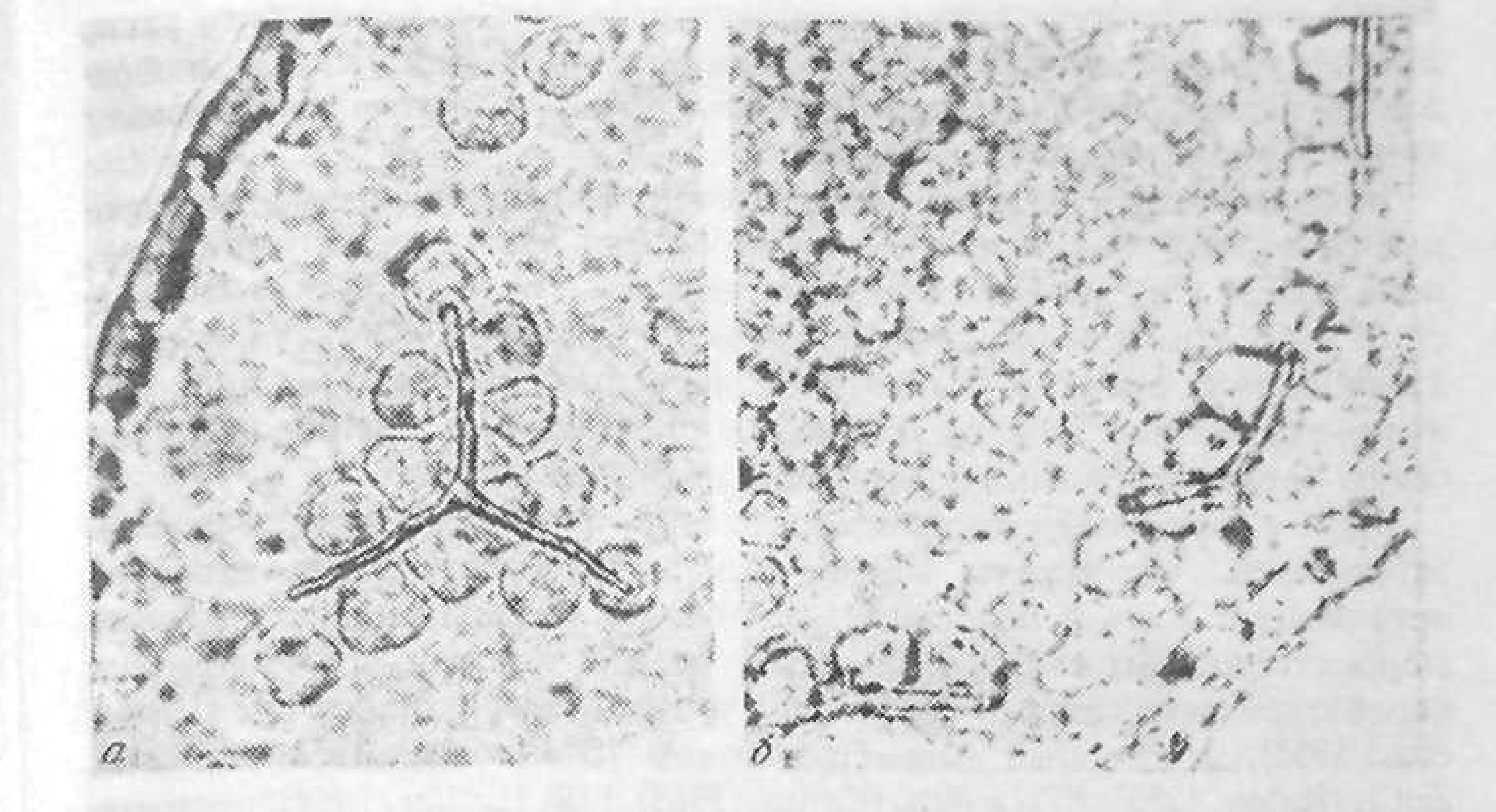


Рис. 57. Спикулогенные клеточные ансамбли у нормального (*а*) и радиализированного (*б*) эмбрионов S. nudus

Билатеральная симметрия в нормальном развитии морского ежа, как известно, впервые проявляется в образовании двух группировок первичномезенхимных клеток; позже в каждой из этих групп, состоящих у S. nudus из 12–14 клеток, появляется и растет трехосная закладка спикулы личиночного скелета (рис. 56, *а*). На соответствующей стадии развития радиализированных зародышей первичномезенхимные клетки распределены равномерно, в виде кольца вокруг развивающегося архентерона; несколько позже в кольце клеток появляются многочисленные (5–10) небольшие клеточные группировки, относительно равномерно рассеянные по кольцу (рис. 56, *б*). В каждой из клеточных группировок возникает в виде гранулы кальцита и растет небольшая скелетная спикула.

Через несколько часов у контрольных зародышей развивается пара относительно крупных спикул (рис. 56, *в*, 57, *а*); у радиализированных зародышей на соответствующей стадии развития оказывается несколько мелких спикул, расположенных кольцом вокруг архентерона (рис. 56, *д*, 57, *б*), т.е. радиальное строение скелета вместо нормального билатерального. Обычное число спикул у зародышей с хорошо выраженной радиализацией 5–8, максимальное число спикул при радиализации в описываемых условиях 11.

Форма спикул радиализированных зародышей обычно трехосная; число первичномезенхимных клеток, образующих каждую спикулу, 3–5. Таким образом, минимальное число спикулогенных клеток, образующих трехосную спикулу, равно трем; каждая из этих трех клеток располагается у одного из лучей спикулы, образуя с двумя другими клетками той же группы углы в 120°. Иногда у радиализированных зародышей развиваются палочковидные спикулы (рис. 57, *б*); минимальное число образу-

ющих такую спикулу первичномезенхимных клеток может быть равно двум; в этом случае, как и при участии трех или четырех клеток в образовании палочковидной спикулы, спикулогенные клетки расположены линейно вдоль растущей спикулы.

На более поздних стадиях развития спикулы радиализированных зародышей теряют правильную трехлучевую (или палочковидную) форму, появляются и растут дополнительные отростки, лучи спикулы изгибаются. В итоге спикулы радиализированных зародышей часто приобретают причудливую форму, в то время как на соответствующих стадиях развития нормальных зародышей спикулы еще сохраняют правильную трехосную форму с прямыми неветвящимися отростками.

Итак, у радиализированных зародышей S. nudus ясно прослеживается зависимость морфологии личиночных спикул от пространственной организации клеток первичной мезенхимы. Радиализация зародышей морских ежей была получена весьма разнообразными воздействиями: обработкой детергентами (Gustafson, Sävhagen, 1950), трипсином (Hörstadius, 1953), некоторыми антиметаболитами (Hörstadius, Gustafson, 1954), $ZnCl_2$ (Rulon, 1955), KCN и NaN_3 (Czihak, 1963), РНК (Lallier, 1964), полиаминами (Lallier, 1966), гликопротеидами (Lallier, 1966c), проназой (Lallier, 1967), папаином (Lallier, 1969), а также изоляцией дорсальной и вентральной половин раннего зародыша (Hörstadius, 1975). Перечисленные работы посвящены изучению механизмов, определяющих полярность и оси развивающегося организма. Радиализация личиночного скелета – одно из проявлений потери билатеральной симметрии (см. гл. II). Во всех упомянутых работах регистрировалось возникновение нескольких радиально расположенных скелетных спикул, предшествующее же распределение спикулогенных клеток не изучалось; использовалась длительная или постоянная инкубация зародышей в растворах испытанных веществ.

Так, Лалье (Lallier, 1969) применил постоянное (от оплодотворения) культивирование зародышей Paracentrotus lividus в 0,02–0,05%-ном растворе папаина и отметил появление у них 6–7 очень разветвленных спикул. В нашей работе кратковременная обработка более концентрированным раствором папаина (0,2%) в сочетани с ЭДТА и встряхиванием дала, по-видимому, сходный эффект. При обработке на стадии мезенхимной бластулы, т.е. после начала миграции первичномезенхимных клеток в бластоцель, можно ожидать более прямого влияния примененных факторов на взаимодействия первичномезенхимных клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, определяющие пространственное распределение первичномезенхимных клеток.

Образование клетками первичной мезенхимы кольца около вегетативного полюса ранней гаструлы – нормальная стадия морфогенеза (Okazaki, 1960, 1975; Wolpert, Gustafson, 1961; Gustafson, 1975) с последующим образованием двух группировок первичномезенхимных клеток по 10–15 клеток в каждой из них (Okazaki, 1960), в чем и проявляется впервые билатеральность развивающегося зародыша. При радиализированном развитии, характеризующемся потерей билатеральной симметрии, мезенхимное кольцо распадается на несколько мелких групп клеток, по 2–5 клеток в каждой; в итоге возникает несколько мелких радиально расположенных спикул. Подобное появление множественных центров кальцификации в кольце первичномезенхимных клеток с последующим развитием нескольких спикул наблюдал Пренан (Prenant, 1926a) у зародышей P. lividus при подкислении морской воды или прибавлении к ней глицерина, NaCl или LiBr.

Если равномерность распределения клеток первичной мезенхимы в кольце столь высока, что не образуется даже мелких агрегатов клеток, а сохраняется линейная, последовательная ориентация клеток, то вместо трехосных спикул появляются палочковидные одноосные. Подобные палочковидные спикулы были найдены Окадзаки (Okazaki, 1960) в синцитиальных цепях мезенхимы зародышей Hemicentrotus pulcherrimus при нарушении нормального спикулогенеза.

Нарушение упорядоченного расположения спикулогенных клеток вследствие обработки папаином приводит в процессе дальнейшего роста спикул радиализированных зародышей к возникновению дополнительных отростков, изгибанию лучей спикул.

Таким образом, при сравнении морфогенеза радиализированного типа личиночного скелета с нормальным спикулогенезом ясно прослеживается зависимость числа, расположения, размера и формы спикул от пространственного распределения первичномезенхимных клеток и формируемых ими синцитиальных спикулогенных группировок.

Значение межклеточных взаимодействий для осуществления нормального спикулогенеза демонстрируется и аномалиями спикулогенеза после обработки додецилсульфатом натрия, которым предшествует анархичность расположения клеток первичной мезенхимы в бластоцеле (Божкова, Исаева, 1984). У подвергнутых обработке додецилсульфатом натрия зародышей Scaphechinus mirabilis на стадиях мезенхимной бластулы и гаструлы клетки первичной и вторичной мезенхимы располагались в бластоцеле неупорядоченными рыхлыми скоплениями. Аномалии спикулогенеза у обработанных зародышей иногда проявлялись в полном отсутствии спикул, чаще же спикулогенез был нарушен лишь частично. К стадии раннего плутеуса в контроле развивались личинки с разной степенью проявления аномалий (недоразвитие одной или обеих рук и др.). Видимо, такие аномалии можно объяснить нарушениями межклеточных взаимодействий клеток первичной мезенхимы друг с другом и с внутренними поверхностями клеток стенки бластулы.

Вероятно, дифференциация клеток первичной мезенхимы может быть нарушена также из-за того, что предшественники этих клеток не прошли нормального этапа формирования микромеров при IV делении дробления. Типичное для IV деления дробления морского ежа качественно и количественно неравное разделение вегетативного квартета бластомеров на макромеры (будущий материал энтомезодермы) и микромеры (будущая первичная мезенхима, дающая затем спикулы личиночного скелета) может быть нарушено и превращено в количественно равное деление разнообразными экспериментальными воздействиями; отсутствие микро-

меров не препятствует дальнейшему развитию плутеусов со скелетными спикулами (Harvey, 1956; Hörstadius, 1973). Додецилсульфат натрия, как и некоторые другие детергенты, примененный в низких концентрациях, изменяет структуру кортикального слоя дробящегося зародыша морского ежа и избирательно подавляет отделение микромеров; у обработанных додецилсульфатом зародышей не развивался личиночный скелет (Tanaka, 1976), что объяснялось подавлением своевременного отделения микромеров (Dan, 1979). Вопреки мнению Дана, отсутствие микромеров на стадии 16 и 32 бластомеров не блокирует дальнейшую дифференцировку клеток первичной мезенхимы (потомков микромеров в нормальном развитии), как спикулогенных клеток (Божкова, Исаева, 1984). Даже микрохирургическое удаление клеток первичной мезенхимы у эмбрионов морского ежа не препятствовало формированию личиночного скелета, хотя с задержкой и дефектами (Hörstadius, 1973; Ettensohn, Mc Clay, 1988), – и это еще одно свидетельство регулятивных возможностей яйца морского ежа.

В уродливых реагрегатах-химерах, возникающих в суспензии бластомеров S. nudus, диссоциированных на стадии средней бластулы, пространственный паттерн спикулогенеза оказывается беспорядочным и дефектным (рис. 58) вследствие анархизации пространственного распределения клеток скелетогенной линии при диссоциации и реагрегации бластомеров.

Таким образом, при различных экспериментальных воздействиях выявлена преемственность пространственной организации клеточных ансамблей первичной мезенхимы и продуцируемых ими спикул личиночного скелета эмбриона морского ежа; морфология спикул детерминируется цитоархитектоникой спикулогенных ансамблей, зависящей в свою очередь от взаимодействий клеток друг с другом и внеклеточным матриксом стенки бластоцеля.

Зависимость морфогенетических событий в раннем развитии морского ежа от взаимодействий клетка–клетка и клетка–субстрат предполагали уже Густафсон и Уолперт (Gustafson, Wolpert, 1963, 1967). С тех пор механизмы таких взаимодействий в развитии морского ежа и других животных стали яснее. Клетки первичной мезенхимы зародыша морского ежа начинают синтезировать специфический набор белков, в том числе белков поверхности (Anstrom et al., 1987; Farach et al., 1987; Shimizu et al., 1988), что определяет изменение их реакций на клеточное и внеклеточное окружение. Как уже упоминалось, выселение клеток первичной мезенхимы у зародыша морского ежа коррелирует с потерей сродства к гиалину (Fink, McClay, 1985), а также эхинонектину – другому компоненту гиалиновой оболочки (Burdsal et al., 1991) – и приобретением сродства к фибронектину, входящему в состав базальной пластинки, которая служит субстратом для миграции первичномезенхимных клеток. Применение антител к фибронектину подавляло миграцию клеток первичной мезенхимы (Katow, 1990). Таким образом, функции фибронектина в морфогенетическом перемещении клеток спикулогенной мезенхимы морского ежа сходны с подобной ролью фибронектина и других компонентов внеклеточного матрикса позвоночных животных (см., например: Boucaut et al., 1991). Помимо фибронектина, для миграции клеток скелетогенной мезенхимы морского ежа существенны, по-видимому, и сульфатированные протеогликаны (Lane, Solursh, 1988), а также другие структурные компоненты внеклеточного матрикса бластоцеля (Katow, Amemiya, 1986).



Рис. 58. Анархизация расположения спикул в реагрегатах эмбриональных клеток S. nudus in vitro

Тем не менее отсутствуют конкретные сведения об анизотропии внеклеточного материала базальной пластинки, т.е. позиционной информации, определяющей пространственное расположение клеток скелетогенной мезенхимы относительно двух основных координатных осей зародыша – анимально-вегетативной и дорсовентральной. Неожиданную визуализацию такого рода позиционных координат можно обнаружить в четкой анизотропии генной экспрессии вдоль анимальновегетативной оси зародыша морского ежа. Такая пространственная анизотропия найдена в экспрессии некоторых генов на стадии бластулы: области, занимаемые транскриптами этих генов и их белковых продуктов, совпадают с областью презумптивной эктодермы; один из этих генов (Sp AN) кодирует белок, сходный с продуктом гена tolloid, контролирующего дорсовентральную полярность в развитии дрозофилы (Lepage et al., 1992 a,b; Reynolds et al., 1992). Наиболее поразительно, что антитела к белковому продукту этого гена морского ежа вызывают радиализацию личиночного скелета (Lepage et al., 1992 a), т.е. нарушение дорсовентральной полярности зародыша морского ежа. Можно добавить, что расположение кольца клеток первичной мезенхимы у эмбриона морского ежа на на-

чальных этапах спикулогенеза примерно соответствует границе между презумптивной эктодермой и энтомезодермой. Поэтому вполне вероятно, что белковый продукт гена SpAN и (или) подобных дифференциально экспрессируемых вдоль анимально-вегетативной оси генов зародыша морского ежа вовлечен *не только* в экспрессию анимально-вегетативной полярности, но и дорсовентральной (как белок tolloid дрозофилы), а также в детерминацию пространственного паттерна клеток спикулогенной мезенхимы.

МОДУЛЯЦИИ ЦИТОАРХИТЕКТОНИКИ СПИКУЛОГЕННОЙ МЕЗЕНХИМЫ И МОРФОЛОГИИ СПИКУЛ IN VITRO

В культурах диссоциированных клеток ранних эмбрионов морских ежей в зависимости от условий культивирования возможна либо реконструкция из смеси бластомеров целых эмбрионов (Giudice, 1962; Giudice, Mutolo, 1970; Millonig, 1975; Spiegel, Spiegel, 1975, 1986), способных метаморфизировать в молодых ежей (Hinegardner, 1975), либо цитодифференцировка отдельных типов клеток без воссоздания целого организма.

Неоднократно предпринимались попытки культивирования в морской воде микромеров (т.е. бластомеров – предшественников первичной мезенхимы), изолированных на стадии 16 бластомеров (Pucci-Minafra et al., 1968; Hagström, Lönnig, 1969; Sano, 1977); в таких условиях культивирования спикулогенез не наблюдался. Не было найдено образования спикул личиночного скелета и при культивировании в морской воде клеток бластулы Strongylocentrotue purpuratus и Lytechinus pictus (Timourian, Watchmaker, 1975). Лишь Оказаки (Okazaki, 1975a) удалось создать подходящие условия для спикулогенеза в клеточной культуре, используя для культивирования изолированных микромеров Hemicentrotus pulcherrimus и Anthocidaris crassipina морскую воду с добавлением сыворотки; тем самым была доказана детерминированность на 16-клеточной стадии развития микромеров как будущего спикулогенного материала. Позже среда Оказаки была использована для получения спикулогенных культур клеток тех же и других (Arbacia punctulata, Strongylocentrotus purpuratus) видов морских ежей из микромеров (Rosenspire et al., 1976; Chamberlain, 1977; Kobayashi, 1977; Harkey, Whiteley, 1980; Kinoshita, Okazaki, 1984; Kitajima, 1986; Matsuda et al., 1988; *Shimizu et al., 1988;* Benson et al., 1990; Kiyomoto, Tsukahara, 1991), клеток первичной мезенхимы стадии мезенхимной бластулы (Mintz et al., 1981; Carson et al., 1985; Decker et al., 1987) и из первичномезенхимных синцитиев стадии гаструлы (Harkey, Whiteley, 1980).

Спикулогенная клеточная культура, обладающая четкими маркерами специфической дифференцировки (синцитиальность и минерализация), может быть использована для исследования особенностей экспрессии морфологических признаков спикулогенеза в экспериментальных условиях однослойной культуры; сравнение спикулогенеза в организме и в клеточной культуре позволяет приблизиться к пониманию факторов, контролирующих цитодифференцировку.

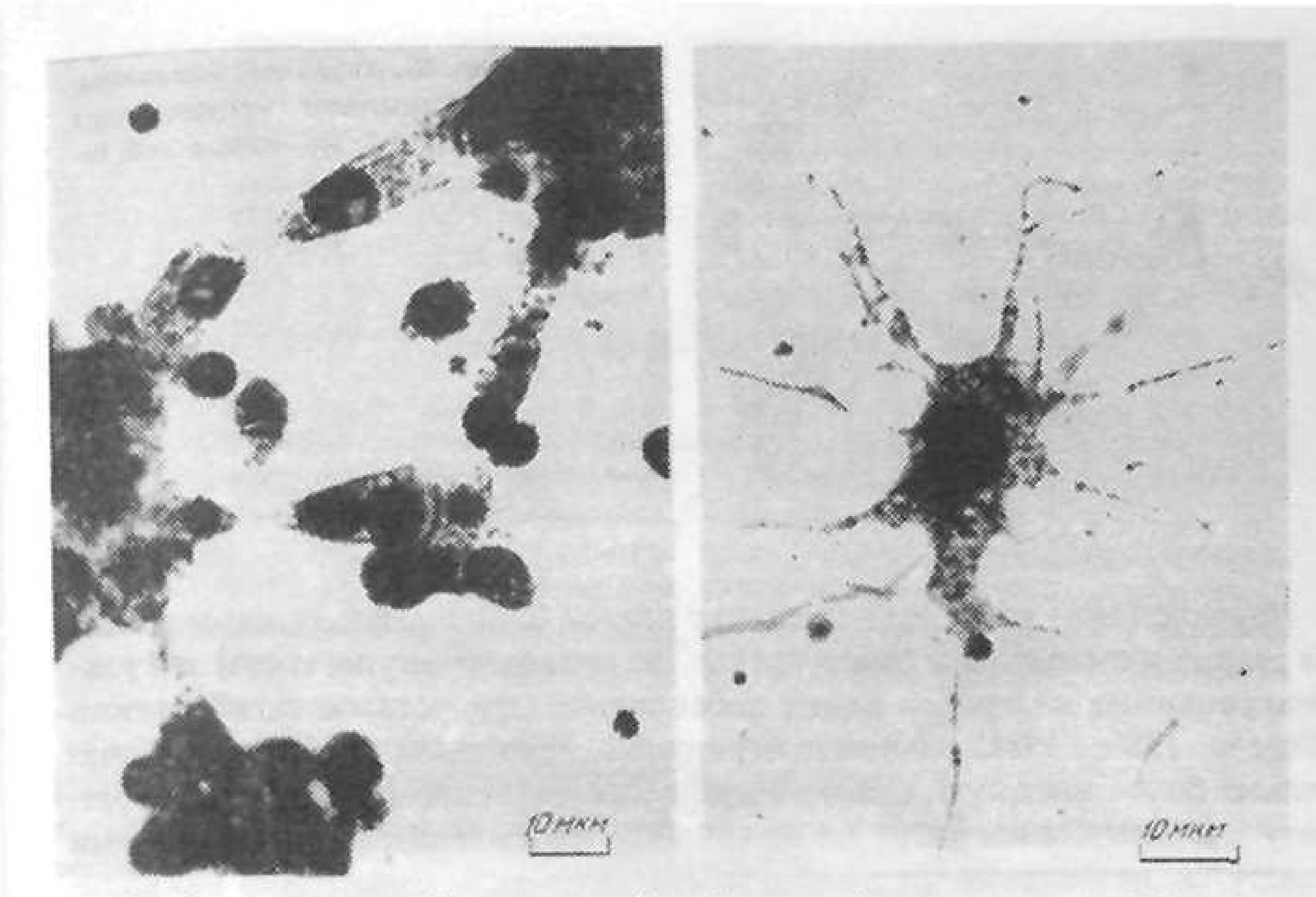


Рис. 59. Клетки первичной мезенхимы S. nudus через 4 ч после начала культивирования

Рис. 60. Мультиполярная клетка первичной мезенхимы (24 ч культивирования)

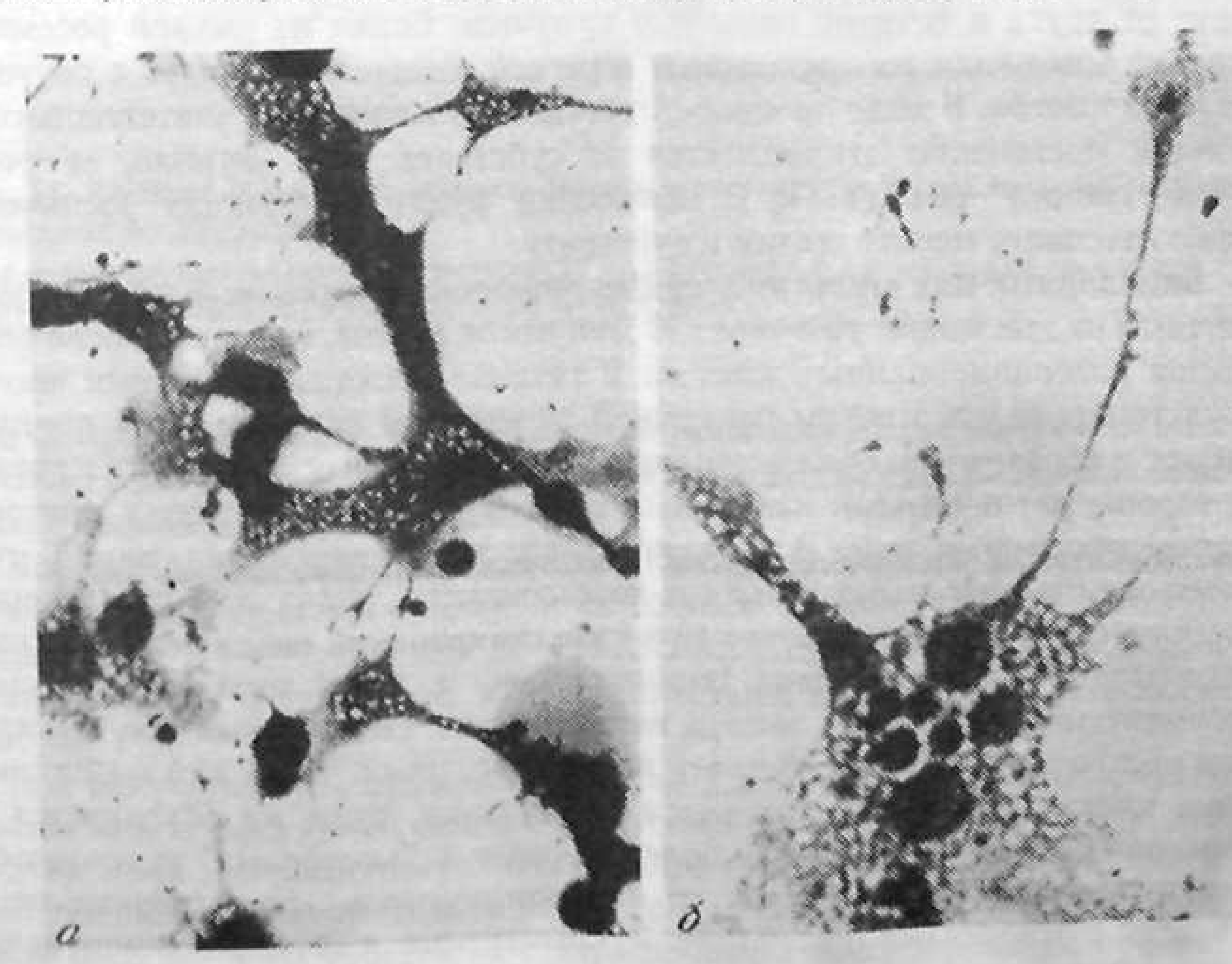


Рис. 61. Синцитии первичной мезенхимы в однослойной культуре (24 ч)
а – сетчатый ламеллярный синцитий; *б* – ламеллярный симпласт

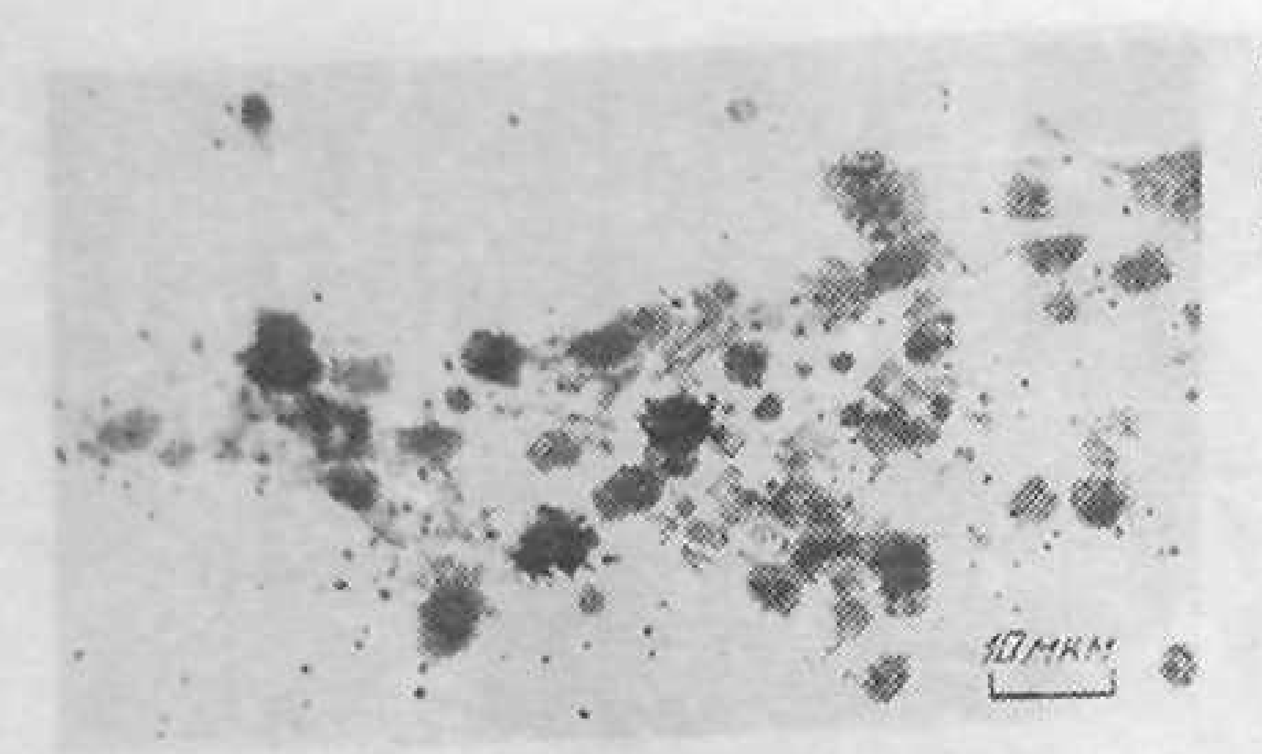


Рис. 62. Химерный мезенхимный симпласт (меченые ядра S. nudus, немеченые – S. intermedius)

Изучался спикулогенез в культуре клеток S. nudus, диссоциированных на стадии мезенхимной бластулы (т.е. до начала спикулогенеза) и культивированных в морской воде с добавлением сыворотки и антибиотиков (Исаева, 1980а, 1981б). Клетки первичной мезенхимы проявляют значительно более высокую адгезивность к искусственному твердому субстрату (стеклу, пластику) по сравнению с эпителиальными клетками бластулы, вследствие чего мезенхимные элементы селективно накапливаются в однослойной фазе. Диссоциированные клетки бластул, лишенные ресничек и округлившиеся после процедуры диссоциации, опускаются на дно чашек Петри, оставаясь сферическими и изолированными друг от друга в течение примерно получаса. Позже из рыхлой россыпи клеток возникают их трехмерные агрегаты, соединенные друг с другом тяжами клеток. В ходе процесса агрегации большинство эпителиальных клеток постепенно открепляется от субстрата либо активно, за счет "бластуляции" (см. гл. II) и появления функционирующих ресничек, либо пассивно, теряя адгезию к субстрату.

Биполярные или мультиполярные первичномезенхимные клетки различимы на дне чашек уже через 30 мин после посева, т.е. сразу после оседания диссоциированных клеток. В течение нескольких первых часов культивирования клетки первичной мезенхимы перемещаются по дну чашек и образуют рыхлые ассоциации, состоящие из одноядерных клеток с хорошо различимыми клеточными границами. На препаратах клеток, зафиксированных через 4 ч после начала культивирования, видно, что клетки образуют псевдоподии и вытягиваются, теряя прежнюю сферическую форму (рис. 59). Через 12 ч культивирования первичномезенхимные клетки представлены биполярными, а чаще мультиполярными элементами с длинными, иногда ветвящимися филоподиями (рис. 60) или же распластанными по субстрату ламеллоподиями. Через 24 ч мезенхимные клетки редко располагаются поодиночке, чаще же объединены в связанные филоподиями или более широкими "мостиками" цитоплазмы синцитиальные сети (рис. 61, *а*) или компактные многоядерные симпласты с отростками (рис. 61, *б*). И компактные и сетчатые синцитиальные образования, как правило, вакуолизированы; гранулы в вакуолях, вероятно, представляют собой органический матрикс минерализации.

При культивировании смеси диссоциированных бластомеров эмбрио-

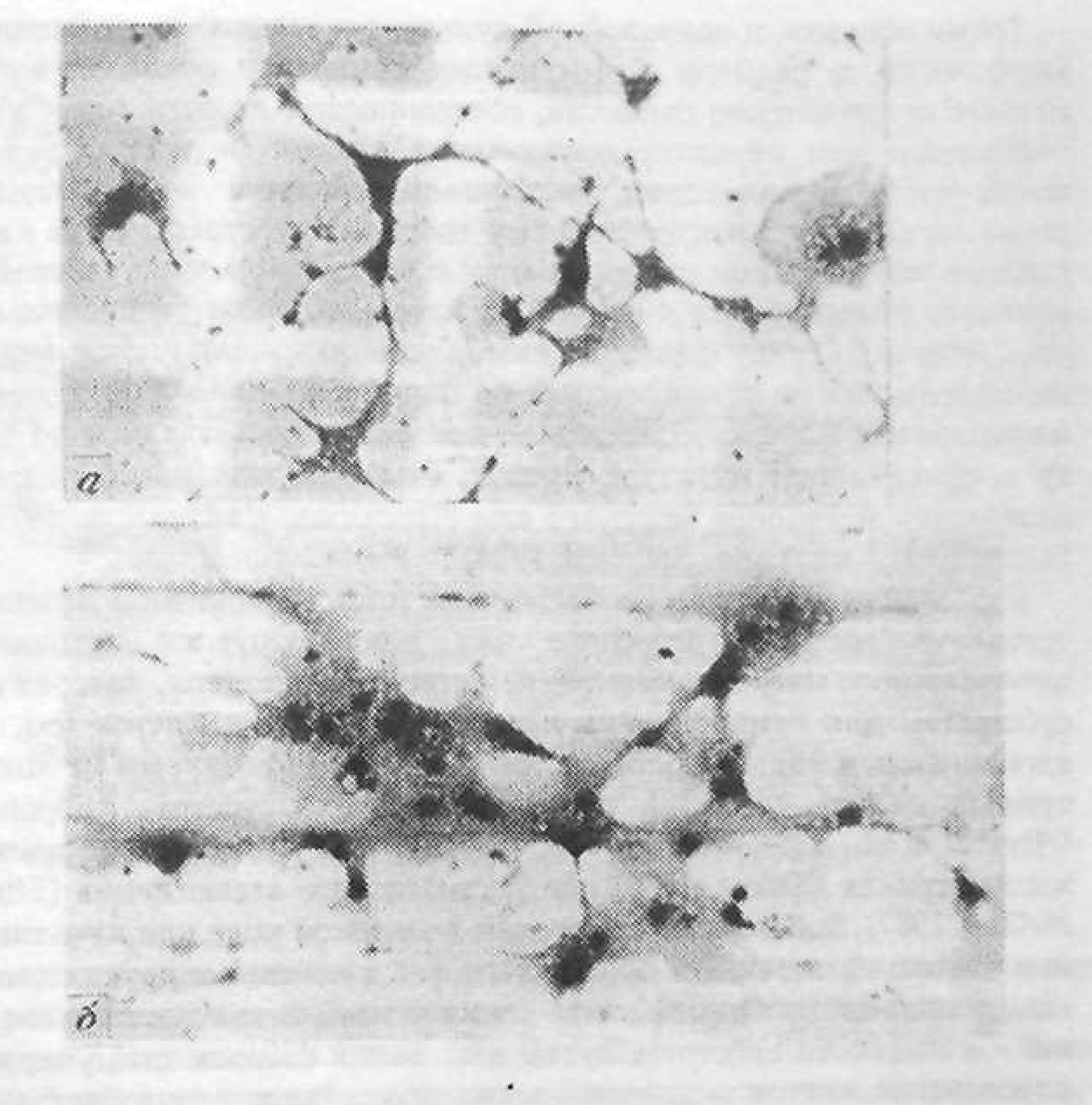


Рис. 63. Влияние структуры субпласта на пространственную организацию ансамблей первичной мезенхимы:

а – преимущественное распластывание на квадратах с напыленным золотом; *б* – контактная ориентация вдоль бороздок поверхности

нов S. nudus, меченных ^{3}H-тимидином, и немеченых бластомеров S. intermedius возникали химерные синцитии и симпласты, содержащие и меченые, и немеченые ядра (рис. 62).

Помимо филоподий, типичных для клеток первичной мезенхимы in vivo, для мезенхимных клеток и синцитиев в однослойной культуре характерны и распластанные по поверхности субстрата ламеллоподии; сами синцитии и симпласты тоже распластаны в двумерной плоскости (см. рис. 61).

При искусственном создании различий адгезивности субстрата путем напыления в вакуумной камере на стекло золота сквозь сеточку для электронной микроскопии распластывание клеток и образование ламелл наблюдались преимущественно на более адгезивной (золоченой) поверхности (рис. 63, *а*). На субстратах с параллельной исчерченностью поверхности мезенхимные синцитии, прикрепляясь преимущественно вдоль бороздок поверхности субстрата, тем не менее сохраняли свою мультиполярную, сетчатую морфологию (рис. 63, *б*).

Таким образом, в однослойной культуре в отличие от ситуации in vivo морфология и размеры мезенхимных синцитиев очень вариабельны; возникают гигантские синцитии, объединяющие десятки ядер; наряду с типичными для первичномезенхимных клеток in vitro филоподиями появляются ламеллоподии, мезенхимные синцитии часто оказываются распластанными по искусственному твердому субстрату, тогда как в организме эмбриона они располагаются в трехмерном пространстве, прикрепляясь филоподиями к стенкам бластоцеля, но не распластываясь по ним. Наличие наряду с филоподиями, типичными для клеток первичной мезенхимы, также ламеллоподий по периферии синцитиев и отдельных мезенхимных клеток, характерное для распластывающихся по субстрату в однослойной культуре клеток, отмечено для клеток первичной мезенхимы эмбрионов морского ежа (Timourian, Watchmaker, 1975; Karp, Solursch, 1985 a,b; Lane, Solursch, 1988).

Поскольку миграция и распределение клеток первичной мезенхимы в организме эмбриона морского ежа контролируются компонентами внеклеточного матрикса внутренней стенки бластоцеля, которая служит субстратом для прикрепления и перемещения этих клеток (см. выше), адгезивность и подвижность клеток первичной мезенхимы in vitro также существенно усиливаются при нанесении на субстрат фибронектина (Miyachi et al., 1984; Katow, 1986, 1987), других компонентов внеклеточного матрикса (Katow, 1986) или растительного агглютинина (Ettensohn, McClay, 1987). Добавление сыворотки к морской воде при культивировании клеток обеспечивает присутствие фибронектина и других необходимых компонентов. Однако и при таких условиях дополнительное усиление адгезивности субстрата путем напыления золотом стимулирует распластывание клеток первичной мезенхимы. Ранее в подобной экспериментальной системе наблюдали преимущественный рост нейритов на участках поверхности с большей адгезивностью (Letourneau, 1975, 1979; Hammarback et al., 1985). Оказалось, что первичномезенхимные клетки и синцитии проявляют в какой-то мере и контактную ориентацию, хотя значительно менее выраженную сравнительно с биполярными миогенными клетками (см. гл. IV).

Итак, при сходстве основной тенденции цитодифференциации первичномезенхимных клеток in vivo и in vitro (от биполярных клеток к мультиполярным с ветвящимися филоподиями и слиянию в синцитии) в однослойной культуре нарушена организация клеточных группировок, образующих спикулогенный синцитий. Однородность адгезивности искусственного субстрата ведет к неупорядоченности группировок первичномезенхимных клеток, вариабельности размеров и формы синцитиев, а повышенная адгезивность искусственного двумерного субстрата – к распластыванию клеток по его поверхности, появлению ламеллоподий и полному слиянию клеток в симпласты. Искусственно созданная неоднородность адгезивности субстрата in vitro вызывает преимущественно прикрепление и перемещение первичномезенхимных клеток и синцитиев по участкам повышенной адгезивности. Наблюдаемые морфологические вариации мезенхимных синцитиев рассматриваются как модификации

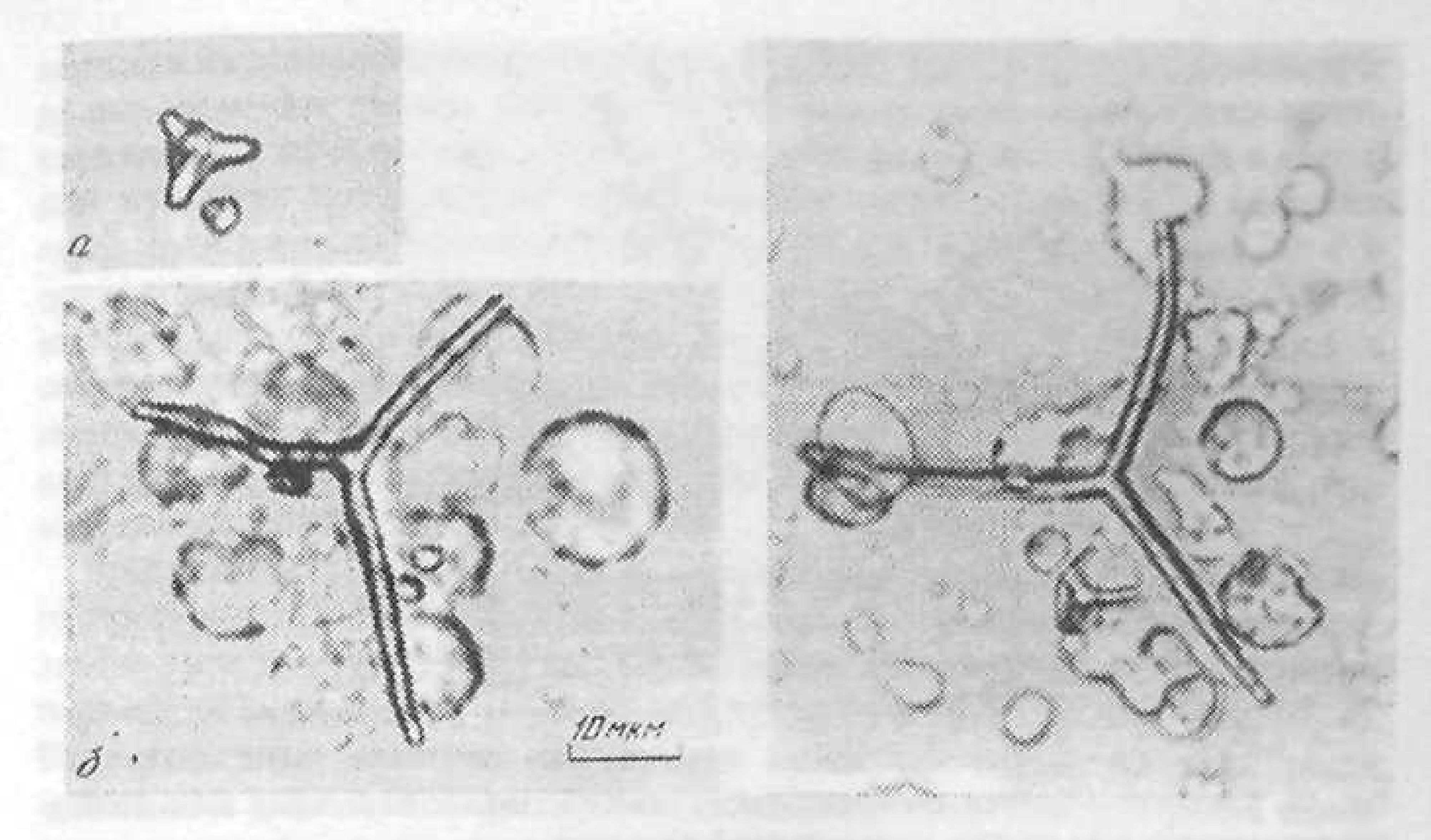


Рис. 64. Спикулогенез в однослойной клеточной культуре
а — ранние закладки спикул; *б* — трехлучевая спикула через 36 ч

Рис. 65. Трехлучевая спикула в однослойной культуре через 48 ч

нормального проявления дифференцировки клеток первичной мезенхимы, вызванные специфическими условиями однослойной культуры.

Известно, что в смеси клеток зародышей двух разных видов морских ежей происходит видоспецифичная рассортировка клеток с последующим развитием уже однородных клеточных реагрегатов (см. гл. II). Однако клетки первичной мезенхимы S. nudus и S. intermedius при совместном культивировании образуют химерные мезенхимные синцитии, содержащие ядра обоих видов. Подобным образом при совместном культивировании миогенных клеток разных видов млекопитающих возникают химерные миосимпласты и миотубы (Yaffe, Feldman, 1965; Yaffe, 1969). Очевидно, в обоих случаях тканеспецифичность узнавания и слияния клеток оказывается более значимой, нежели видоспецифические различия.

После 24 ч культивирования клеток в морской воде с сывороткой в цитоплазме мезенхимных синцитиев и реже в обособленных клетках появляются отдельные гранулы кальцита, сначала округлой, а затем треугольной (точнее, тетраэдрической) формы (рис. 64, *а*). В течение вторых суток культивирования гранулы кальцита растут в виде спикул, обычно характерной для эмбрионов морских ежей трехлучевой формы (рис. 64, *б*), реже в виде одноосных палочек (Исаева, 1981б). На третьи сутки культивирования начинается разрушение мезенхимных спикулогенных синцитиев, рост спикул прекращается (рис. 65). Помимо крупной трехлучевой спикулы, в тех же мезенхимных клеточных ансамблях возникают дополнительные гранулы кальцита или небольшие спикулы (рис. 64, *б*, 65).

Все появившиеся в однослойной клеточной культуре спикулы, макси-

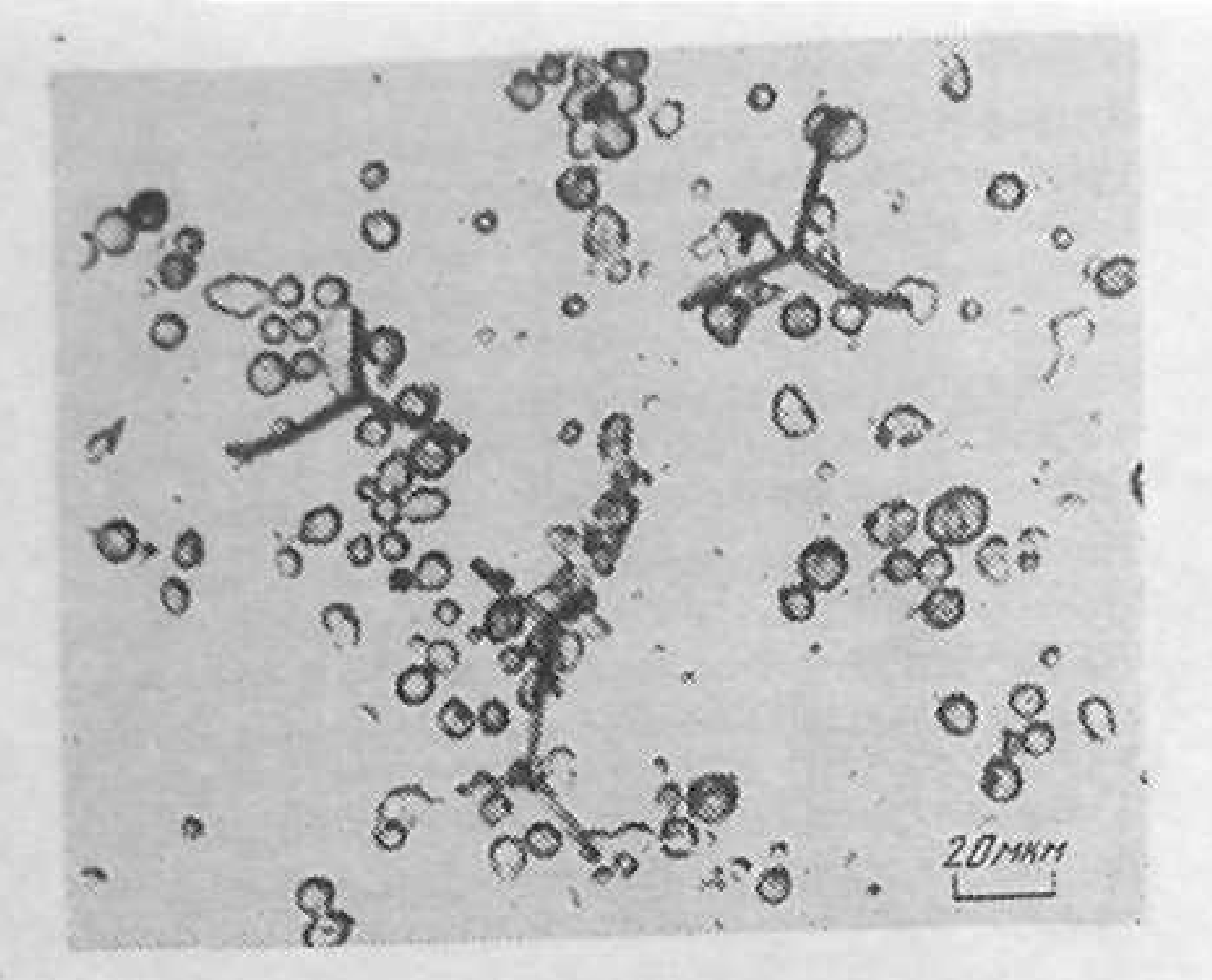
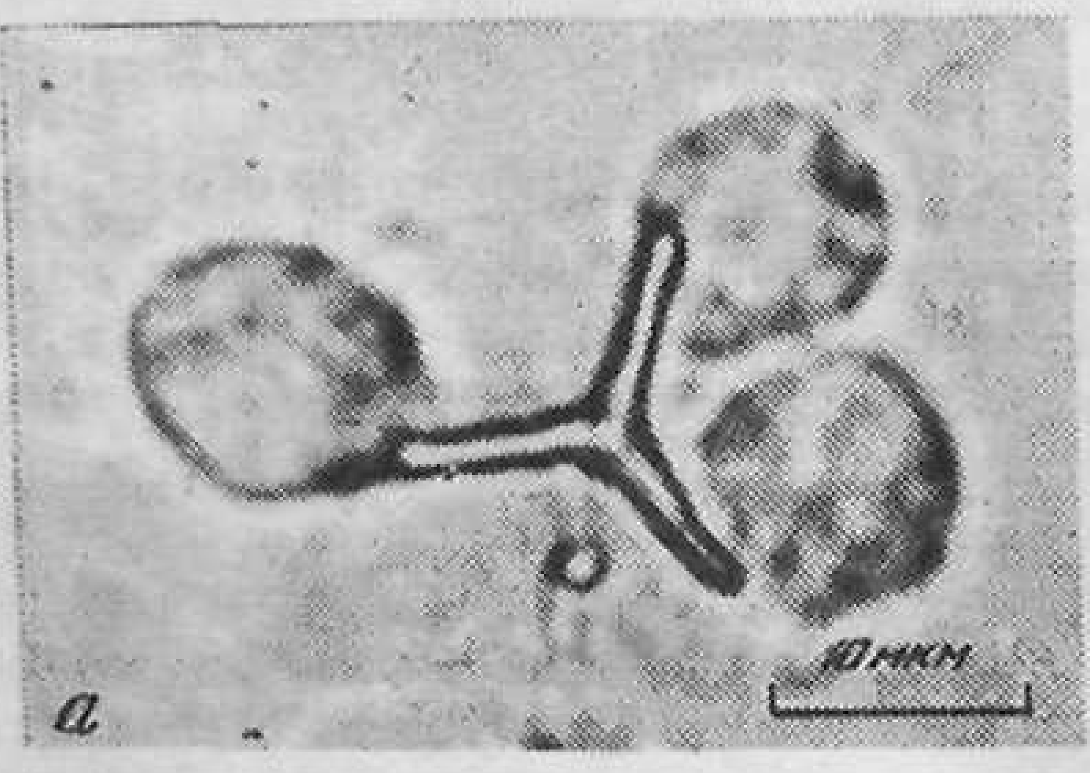


Рис. 66. Контактная плоскостная ориентация спикулогенных клеточных ансамблей и продуцируемых ими спикул в однослойной культуре



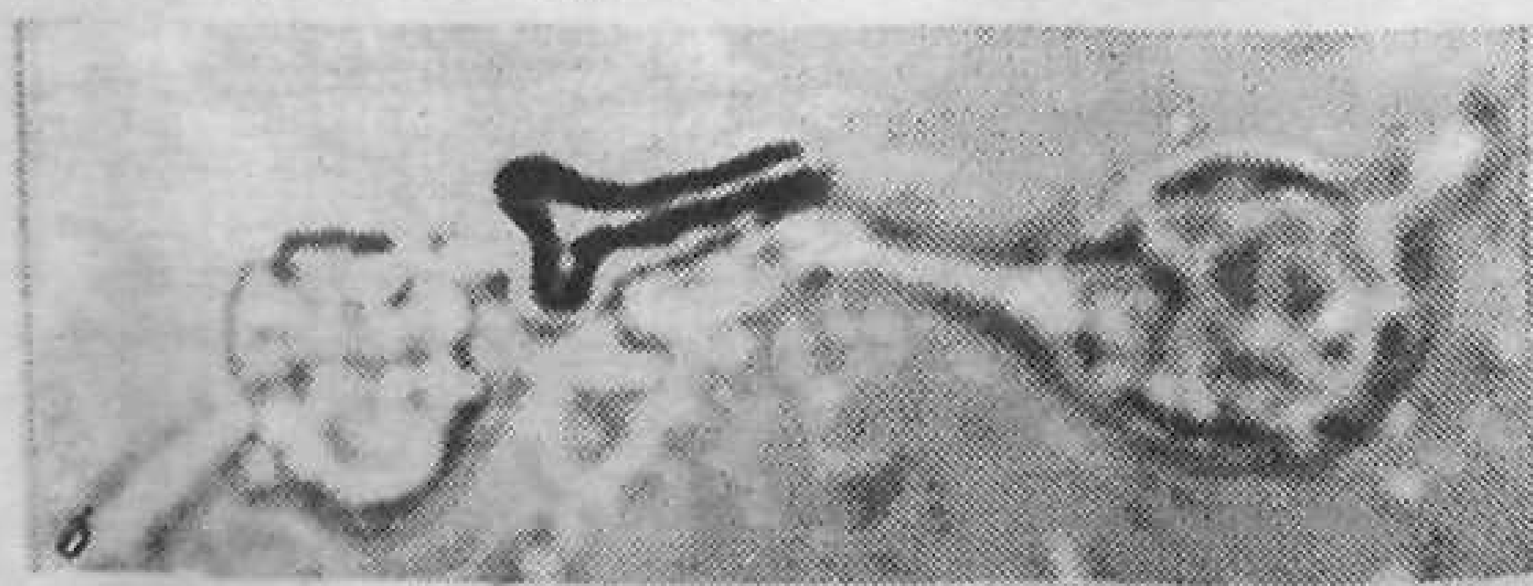


Рис. 67. Зависимость морфологии спикул в однослойной культуре от числа и расположения спикулогенных клеток

а – образуемая тремя клетками трехлучевая спикула; *б* – палочковидная спикула, образуемая двумя клетками

мальная численность которых наблюдается на третьи сутки культивирования, ориентированы, как и спикулогенные мезенхимные синцитии, параллельно плоскости искусственного субстрата (рис. 65, 66). В клеточной культуре преобладают типичные для ранних эмбрионов морских ежей трехлучевые скелетные спикулы (рис. 64–66). Так, через 30 ч в однослойной фазе в контроле из 450 просмотренных спикул 246 (54,7%) имели *правильную трехлучевую* форму, 162 (35%) – трехлучевую с недоразвитием одного или двух лучей и лишь 42 (9,3%) были палочковидными. Сферическая и затем тетраэдрическая (предшествующая трехлучевой) формы в контрольных культурах наблюдались лишь у самых ранних, самых мелких закладок спикул.

Прослеживается отчетливая зависимость морфологии спикул in vitro от пространственной организации спикулогенных клеток. Для формирования трехлучевой спикулы необходимы, как минимум, три клетки первичной мезенхимы, образующие треугольную группировку (рис. 67, *а*). Палочковидные спикулы образуются путем преимущественного роста одного или двух лучей трехлучевого "зачатка" спикулы; для роста такой спикулы необходимо линейное расположение спикулогенных клеток, минимальное число которых оказывается равным двум (рис. 67, *б*).

Вследствие селективной адгезивности к искусственному субстрату *клетки первичной мезенхимы накапливаются в однослойной фазе*, но часть их оказывается в составе взвешенных трехмерных реагрегатов. Во взвешенных клеточных реагрегатах контрольных культур через 20–30 ч также преобладали трехлучевые спикулы. Доля аберрантных спикул существенно возрастала лишь спустя 36–48 ч от начала культивирования (Исаева, 1981б). При высокой плотности посева клеток появляются весьма крупные (диаметром 0,5–1,0 мм) сферические или слегка удлиненные агрегаты клеток, содержащие на вторые сутки культивирования множество спикул (рис. 68). Форма спикул на поздних стадиях культивирования (48 ч) становится аберрантной, появляются многочисленные дополнительные отростки спикул (рис. 68), изредка возникают перфорированные спикулы (рис. 69), отсутствующие при нормальном личиночном спикулогенезе S. nudus и не менее атипичные дугообразно изогнутые спикулы (рис. 70).

В *дифференцирующейся* спикулогенной культуре клеток эмбрионов морских ежей появление кристаллических скелетных спикул служит четким маркером дифференцировки (Okazaki, 1975; Harkey, Whiteley, 1980, 1985; Mintz et al., 1981; McCarthy, Spiegel, 1983; Blankenship, Benson, 1984; Kinoshita, Okazaki, 1984; Carson et al., 1985; Kitajima, 1986; Decker et al., 1987; Benson et al., 1990; Kiyomoto, Tsukahara, 1991).

Некоторые характерные особенности морфологии личиночных спикул морских ежей, прежде всего наличие или отсутствие перфорации, по-видимому, детерминируются генетически наследуемыми различиями спикулогенных клеток (линия микромеры – первичная мезенхима). Об этом свидетельствуют межвидовые трансплантации микромеров (Ubisch, 1936), а также различия в форме спикул в культурах микромеров разных видов ежей (Okazaki, 1962, 1975). При этом у каждого вида морфология

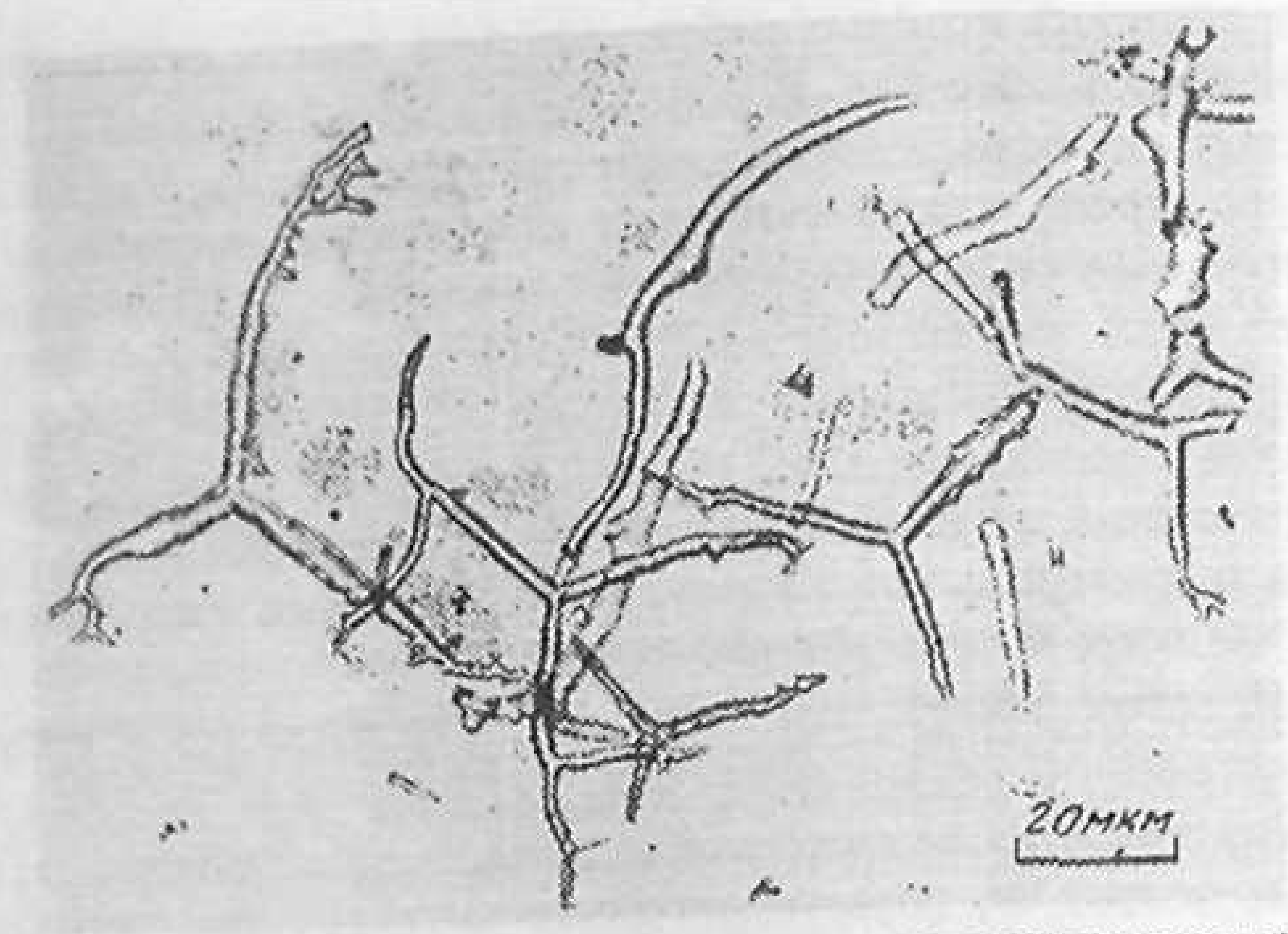


Рис. 68. Аберрантная морфология спикул в агрегате суспензионной культуры

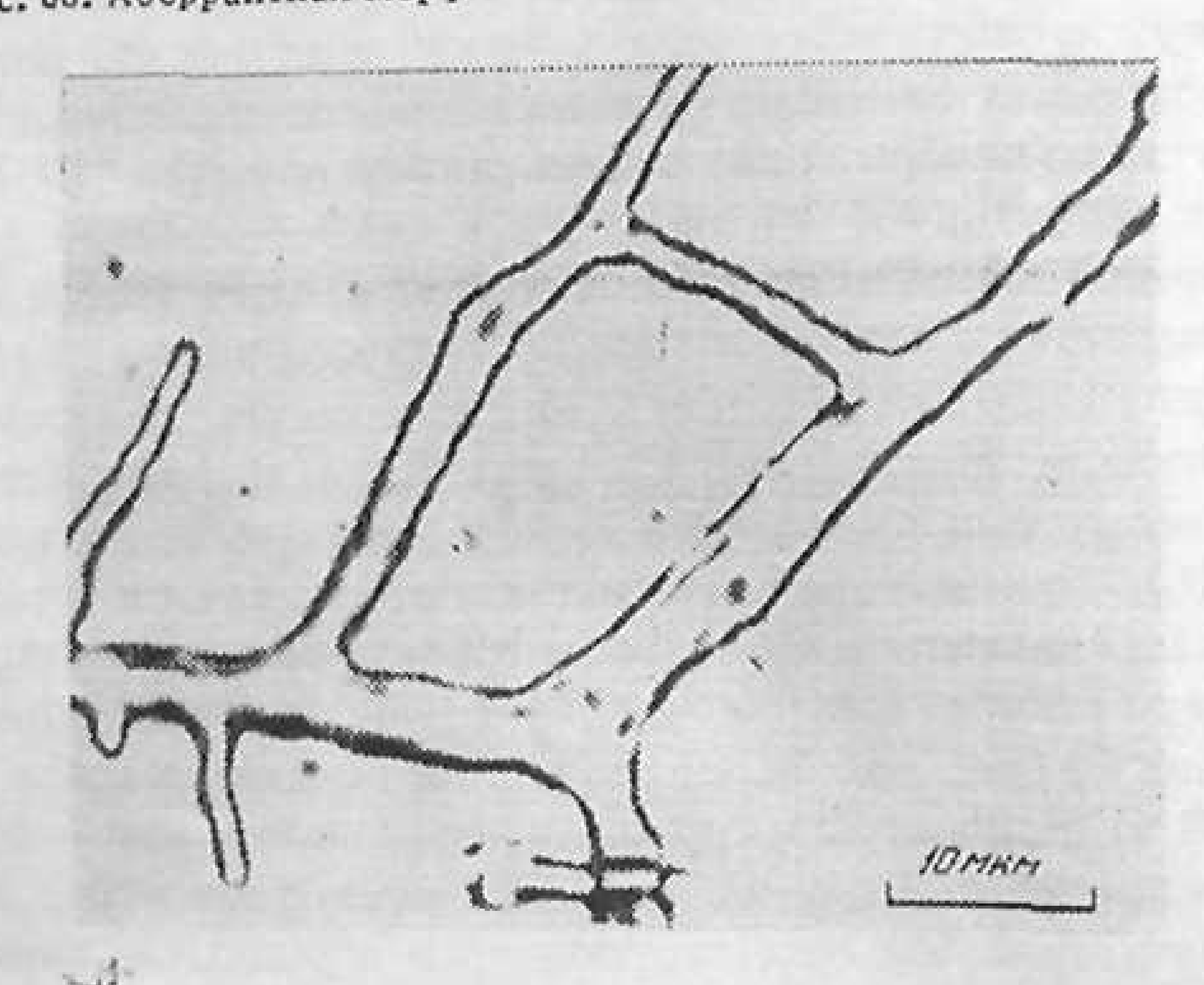


Рис. 69. Участок перфорированной спикулы из суспензионной культуры

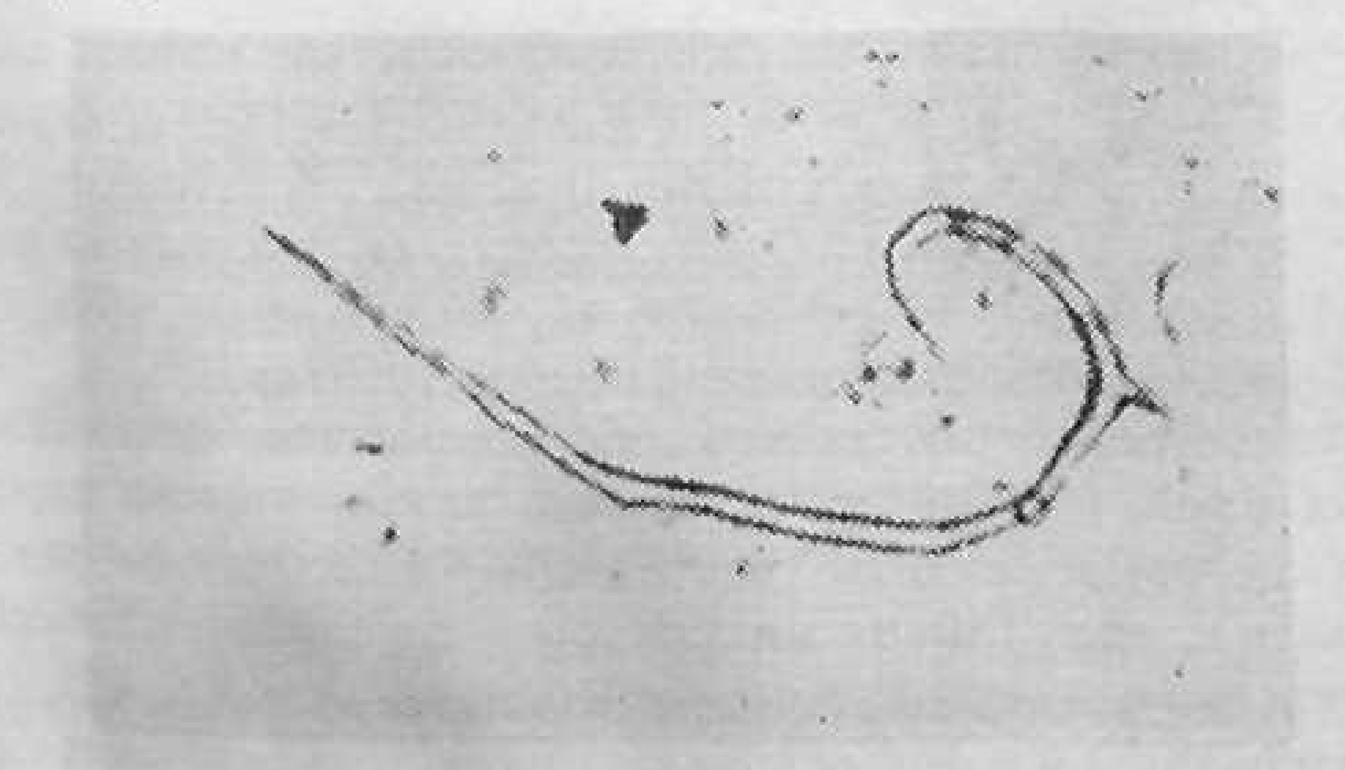


Рис. 70. Дугообразно изогнутая спикула (суспензионная культура)

спикул in vivo и in vitro зависит от пространственной архитектоники спикулогенных синцитиальных ансамблей (Prenant, 1926; Okazaki, 1962; Gustafson, Wolpert, 1963; Harkey, Whiteley, 1980). В условиях культивирования вне организма сохраняются некоторые характерные черты морфологии ларвальных спикул: наличие или отсутствие перфорации, весьма стойка тенденция к возникновению ранних трехлучевых форм.

Некоторые исследователи, изучавшие спикулогенез в клеточных системах in vitro (Okazaki, 1975a; Kobayashi, 1977; Kinoshita, Okazaki, 1984), подчеркивали сходство его с нормальным образованием спикул у целого эмбриона. Действительно, основное направление цитодифференцировки первичной мезенхимы (образование спикулогенных синцитиев) и конечное проявление дифференцировки (образование скелетных спикул) одни и те же in vivo и in vitro; морфология ранних закладок спикул, как правило, одинакова в организме эмбриона и в клеточной культуре. Однако отсутствие в условиях культуры факторов, контролирующих упорядоченность пространственного распределения клеток, и наличие двумерного искусственного субстрата с однородной адгезивностью приводят к существенным модификациям морфологии мезенхимных синцитиев и продуцируемых ими скелетных спикул.

В однослойной фазе и в трехмерных реагрегатах клеток первичной мезенхимы S. nudus возникают как гигантские синцитии с множественными закладками спикул, так и мелкие, образуемые двумя-тремя клетками. В крупных синцитиях возможно одновременное развитие нескольких скелетных спикул, что не наблюдается при нормальном спикулогенезе in vivo. Уже на ранних этапах спикулогенеза in vitro появляются не только типичные для эмбриона морского ежа трехосные спикулы, но также и одноосные, палочковидные, что обнаружено и в исследованиях Окадзаки (Okazaki, 1975a; Kinoshita, Okazaki, 1984). В культурах клеток первичной мезенхимы S. purpuratus, по-видимому, преобладают палочковидные спикулы (Carson et al., 1985; Decker et al., 1987). В культурах клеток эмбрионов S. nudus прослеживается отчетливая преемственность пространственной организации спикулогенных мезенхимных группировок (треугольное или линейное расположение клеток) и морфологии развивающихся спикул.

Отклонения от типичной морфологии скелетных спикул особенно выражены на поздних этапах спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток S. nudus, когда появляются аберрантные спикулы с дополнительными отростками, причудливо изогнутые и весьма отличные по форме от спикул нормального эмбриона. Для однослойной культуры клеток первичной мезенхимы характерна плоскостная контактная ориентация спикул (см. гл. IV и VI) – расположение их в одной плоскости, определяемой распластыванием спикулогенной мезенхимы по поверхности искусственного субстрата. В трехмерных же реагрегатах из суспензионной культуры и организация спикул на поздних стадиях спикулогенеза становится трехмерной. Ультраструктура спикулогенных синцитиев изучена у взрослых морских ежей (Shimizu, Yamada, 1976) и на ранних стадиях спикулогенеза у зародышей ежей (Gibbins et al., 1969; Schemekel, 1975; Decker, Len-

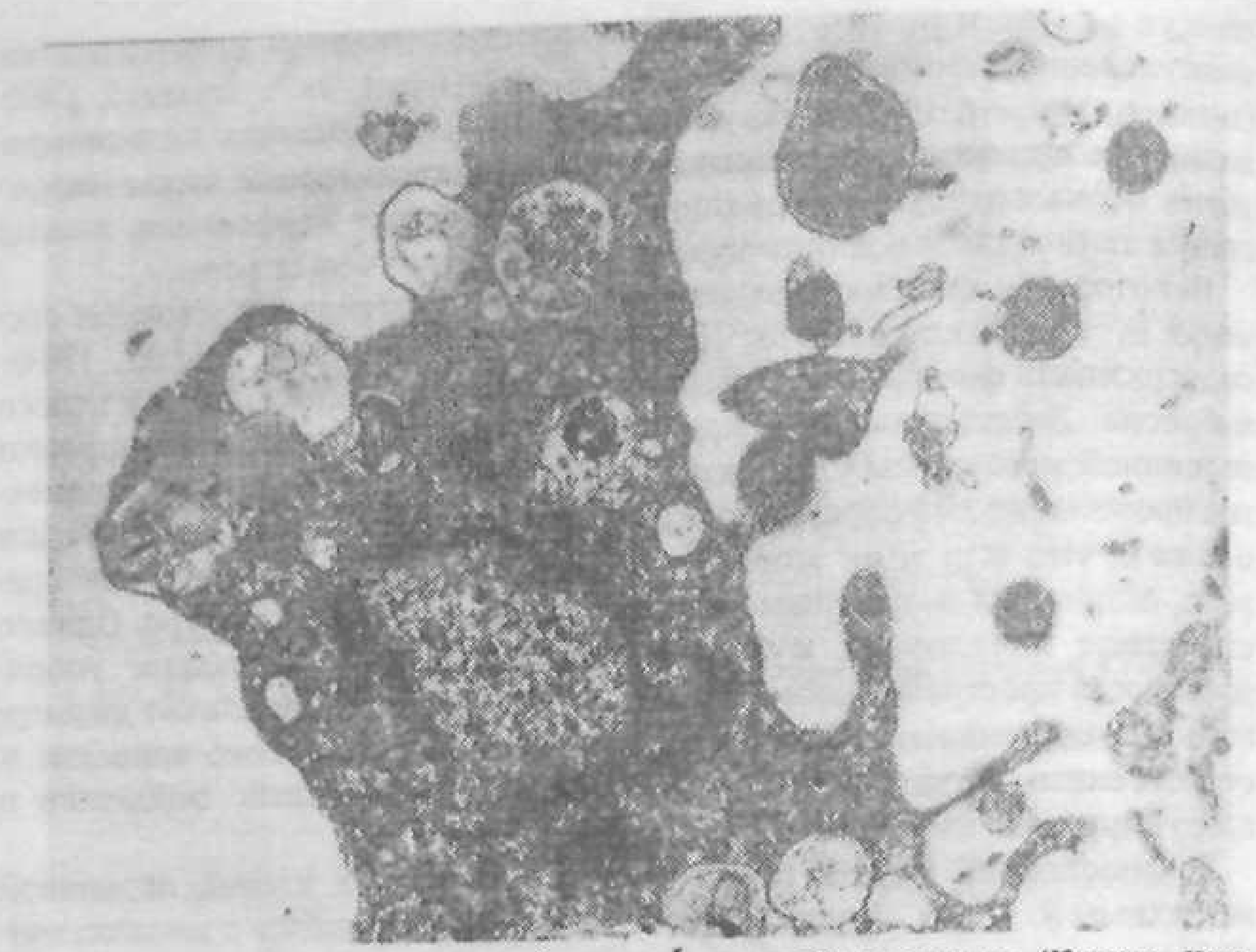


Рис. 71. Ультраструктура одноядерной клетки первичной мезенхимы (Керкис, Исаева, 1984)

narz, 1988); поздние стадии зародышевого спикулогенеза исследованы менее полно (Millonig, 1970), а ультраструктура культивируемых спикулогенных клеток эмбрионов Strongylocentrotus nudus была описана нами впевые (Керкис, Исаева, 1984). Позже было проведено электронно-микроскопическое исследование спикулогенеза культивируемых клеток первичной мезенхимы S. purpuratus (Decker et al., 1987).

Для функционирующих спикулогенных клеток (рис. 71) характерно присутствие мембранных пузырьков и крупных вакуолей, содержащих аморфный материал; в таких специализированных вакуолях встречается электронно-плотный материал, представляющий собой, как мы полагаем, центр начинающейся минерализации. На ранних стадиях кальцификации вакуоль с ясно различимой мембраной окружена цистернами гранулярной эндоплазматической сети и митохондриями. Кроме специализированных, вовлеченных в процесс кальцификации вакуолей, в цитоплазме спикулогенных клеток обычны аутофагосомы с перевариваемым желтком и крупные вакуоли с миелиноподобными тельцами и электронноплотными включениями. Как и все клетки раннего зародыша морского ежа, спикулогенные клетки содержат включения желтка и липидов. Ядро окружено мембранами комплекса Гольджи; в цитоплазме много свободных и прикрепленных к мембранам эндоплазматической сети рибосом, округлых митохондрий с редкими кристами и электронноплотными гранулами в матриксе.

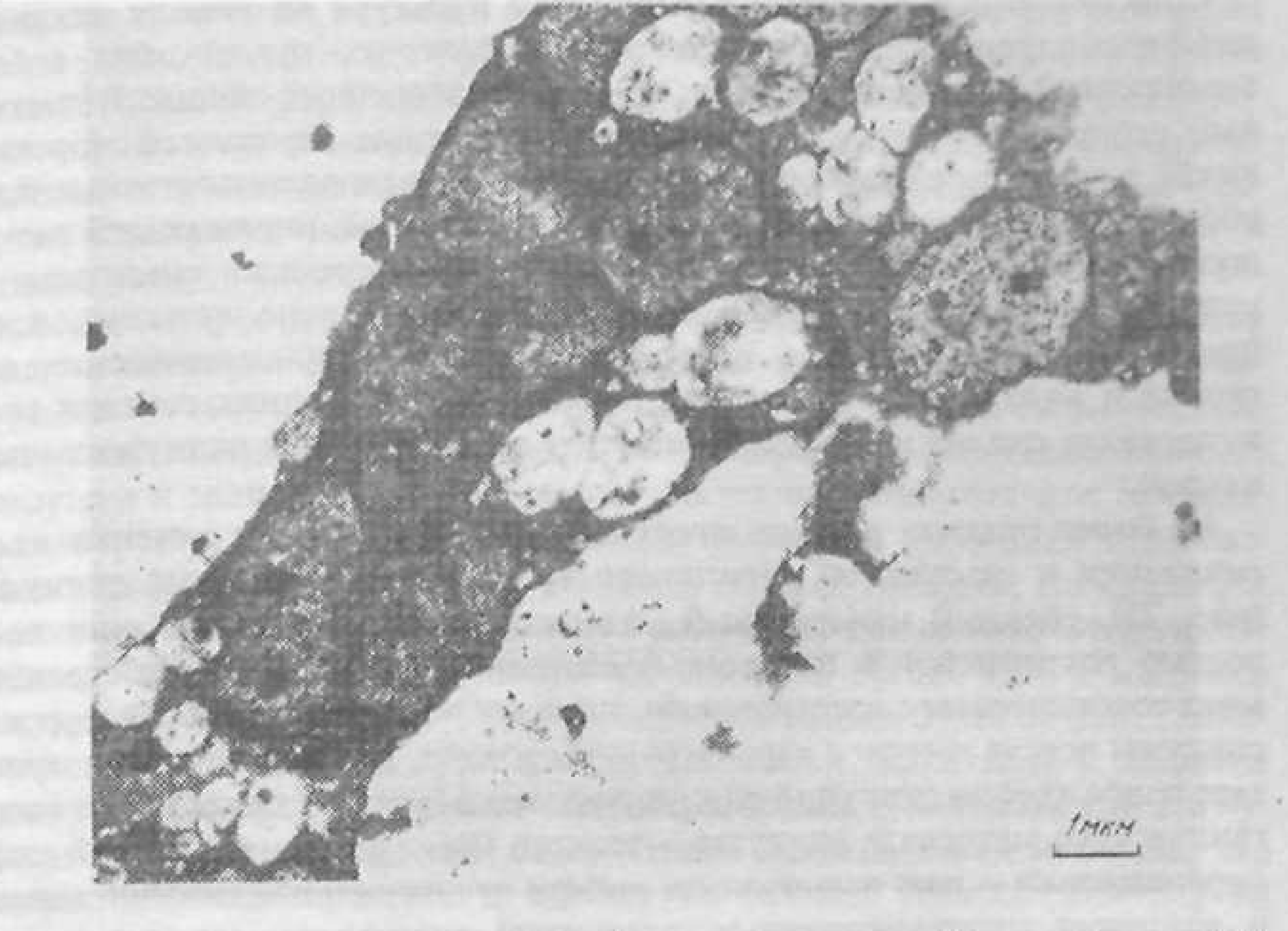


Рис. 72. Спикулогенный симпласт через 30 ч культивирования (Керкис, Исаева, 1984)

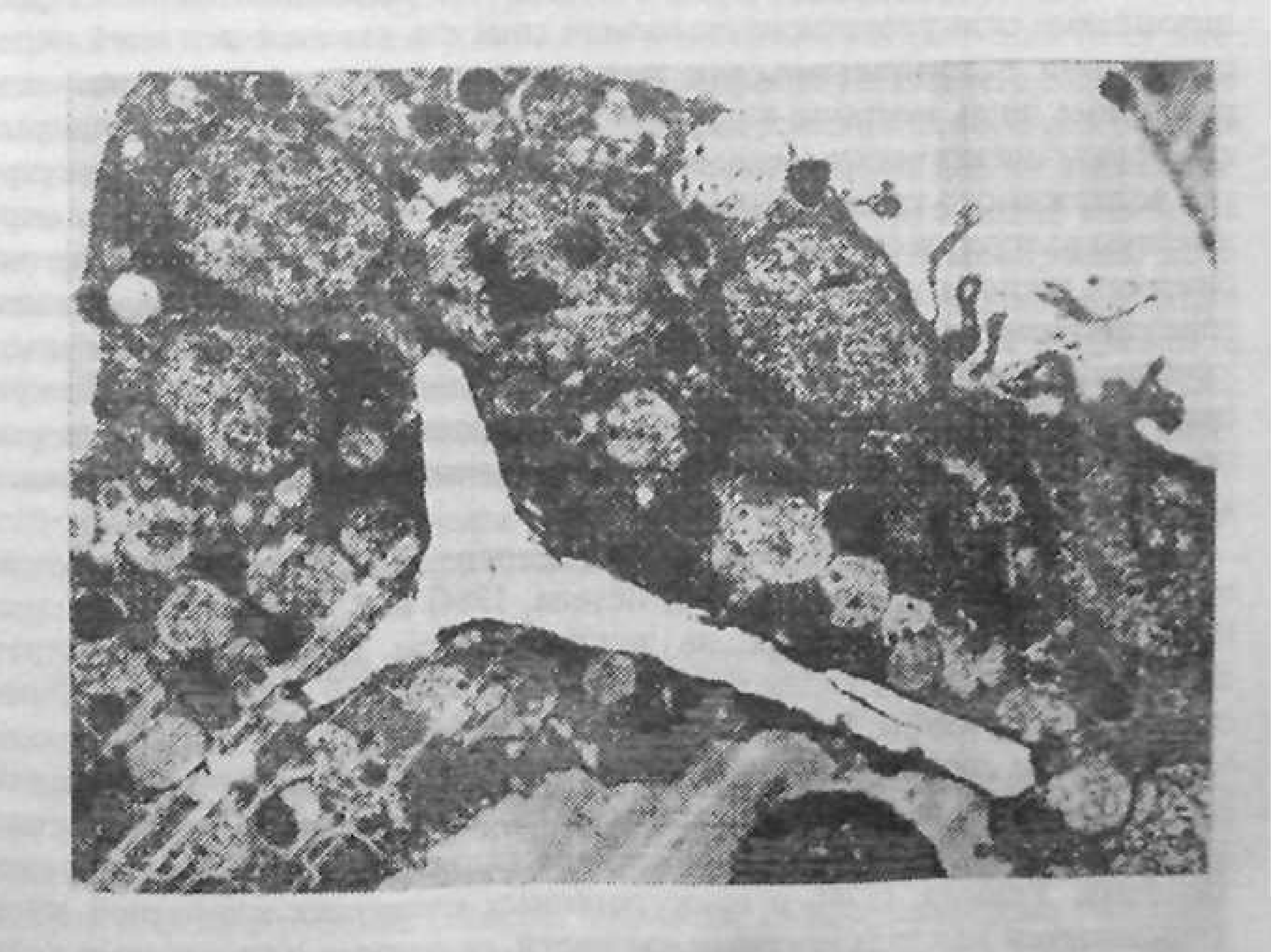


Рис. 73. Спикулогенный симпласт с растущей спикулой через 44 ч (Керкис, Исаева, 1984)

Спикулогенные синцитии в клеточной культуре на ранних стадиях дифференцировки имеют различную морфологию, представляя собой компактный многоядерный симпласт или расчлененный синцитий (подобный описанному другими авторами у интактных зародышей морских ежей), в котором содержащие ядро и основные органеллы клеточные тела обособлены, соединяясь с безъядерной цитоплазмой, окружающей растущую спикулу, узким тяжем, "стеблем". Спикулогенные симпласты в условиях культуры иногда содержат множество тесно лежащих ядер (рис. 72). Ультраструктура ядер, большинства цитоплазматических органелл и включений у синцитиев и симпластов на ранних стадиях спикулогенеза сходна и подобна описанной для одиночных спикулогенных клеток.

На более поздних стадиях спикулогенеза (44 ч) внутри мезенхимных синцитиев и симпластов появляются трехлучевые скелетные спикулы (рис. 73), твердый минеральный материал спикулы частично или полностью сохраняется в процессе подготовки материала к электронно-микроскопическому исследованию, поэтому на срезах с одной стороны спикулы всегда имеются характерные бороздки, возникающие в результате повреждения спикулой стеклянного ножа (рис. 73). Сохранение неорганического материала спикулы – четкого маркера специфической дифференцировки – дает возможность выбора нужных стадий спикулогенеза и изучения пространственных отношений органоидов цитоплазмы и внутриклеточного минерального материала. В массивной многоядерной цитоплазме спикулогенного симпласта спикула кажется лежащей непосредственно в цитоплазме, так как разделяющая их мембрана четко различима лишь местами; под мембраной поверхность спикулы покрыта аморфным органическим веществом. В некоторых случаях видна экструзия содержимого транспортной спикулогенной вакуоли в полость, окружающую растущую спикулу. В цитоплазме симпласта в непосредственной близости располагаются ядра, комплексы Гольджи, специализированные спикулогенные вакуоли, содержащие материал для растущей спикулы, и конечный продукт деятельности спикулогенного симпласта – спикула (рис. 73). Спикулу окружают специализированные вакуоли, которые, по-видимому, выполняют транспортную функцию, обеспечивая дальнейшую кальцификацию, т.е. рост спикулы.

При электронно-микроскопическом исследовании спикулогенных клеток и синцитиев in vitro (Керкис, Исаева, 1984) выбор для исследования компактных, уплощенных на искусственном двумерном субстрате синцитиев позволяет наблюдать в непосредственной близости на одном срезе все структуры, пространственно разобщенные в организме зародыша. Все типы специализированных структур, описанных для скелетогенных клеток зародышей и взрослых ежей, характерны и для культивируемых спикулогенных клеток. Так же как в склероцитах взрослых ежей (Shimuzu, Yamada, 1976), в спикулогенных синцитиях клеточной культуры имеется два типа крупных вакуолей, связанных с процессами кальцификации и аутофагии. По-видимому, аппарат Гольджи в спикулогенных клетках продуцирует и лизосомы, что обеспечивает утилизацию запасенных еще в оогенезе желтка и липидов. (Попутно заметим, что этот запас питательных веществ допускает возможность дифференцировки клеток в такой простой среде, как морская вода с небольшим количеством сыворотки.) Наличие в матриксе митохондрий плотных гранул, возможно, связано с процессом кальцификации (отложение кальция в форме фосфата в матриксе митохондрий с последующим переносом кальция в специализированные вакуоли).

Общая морфология спикулогенных клеток и синцитиев (развитие эндоплазматической сети с рибосомами, аппарата Гольджи и продуцируемых им секреторных пузырьков) подобна морфологии типичных секреторных клеток. Можно представить следующую последовательность ведущих к минерализации процессов: синтез необходимых для связывания, переноса и преципитации кальция белков на рибосомах эндоплазматической сети, перемещение белков в аппарат Гольджи, гликолизирование их, транспорт в мембранной "упаковке" связанного гликопротеидами кальция и кристаллизация кальцита на органическом матриксе внутри крупной вакуоли. У эмбрионов ежа найдены белки (или гликопротеины), специфичные для клеток первичной мезенхимы и матрикса спикул (см выше); обнаружен ассоциированный с личиночными спикулами связывающий кальций белок (Iwata, Nakano, 1986); показано, что моноклональные антитела к одному из белков, локализованному на поверхности клеток первичной мезенхимы и в матриксе спикул, подавляют кальцификацию в культуре этих клеток (Carson et al., 1985).

Отличие спикулогенеза у иглокожих от типичной секреции (и от внеклеточной минерализации как варианта секреции) в том, что содержимое вакуолей секретируется не во внеклеточное пространство, а в огромную вакуоль внутри клетки, по существу представляющую аналог внеклеточного пространства. На самых поздних стадиях минерализации мембрана внутриклеточной вакуоли сливается с плазматической мембраной, дальнейший рост скелета идет внеклеточно. Внеклеточная минерализация осуществляется в процессе роста палочковидных спикул S. purpuratus in vitro (Decker et al., 1987); авторы полагают, что полость растущей спикулы всегда сообщается с внеклеточным пространством, за исключением самых ранних стадий спикулогенеза. Однако спикулогенез в культуре клеток эмбрионов S. nudus, по нашим данным (Керкис, Исаева, 1984), идет как внутриклеточный процесс до стадии трехлучевой закладки спикулы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОЙ ФУНКЦИИ ЦИТОСКЕЛЕТА В СПИКУЛОГЕНЕЗА IN VITRO

Поскольку морфофункциональная клеточная архитектоника зависит, как известно, от организации цитоскелета, было испытано влияние на спикулогенез in vitro ингибиторов, нарушающих структуру микрофиламентов и микротрубочек (Исаева, Чуриков, 1988б), проведено электронно-микроскопическое изучение цитоскелетных структур (совместно с А.Ю. Керкисом) и выявление фибриллярного актина родаминфаллоидином в спикулогенных клетках и синцитиях.

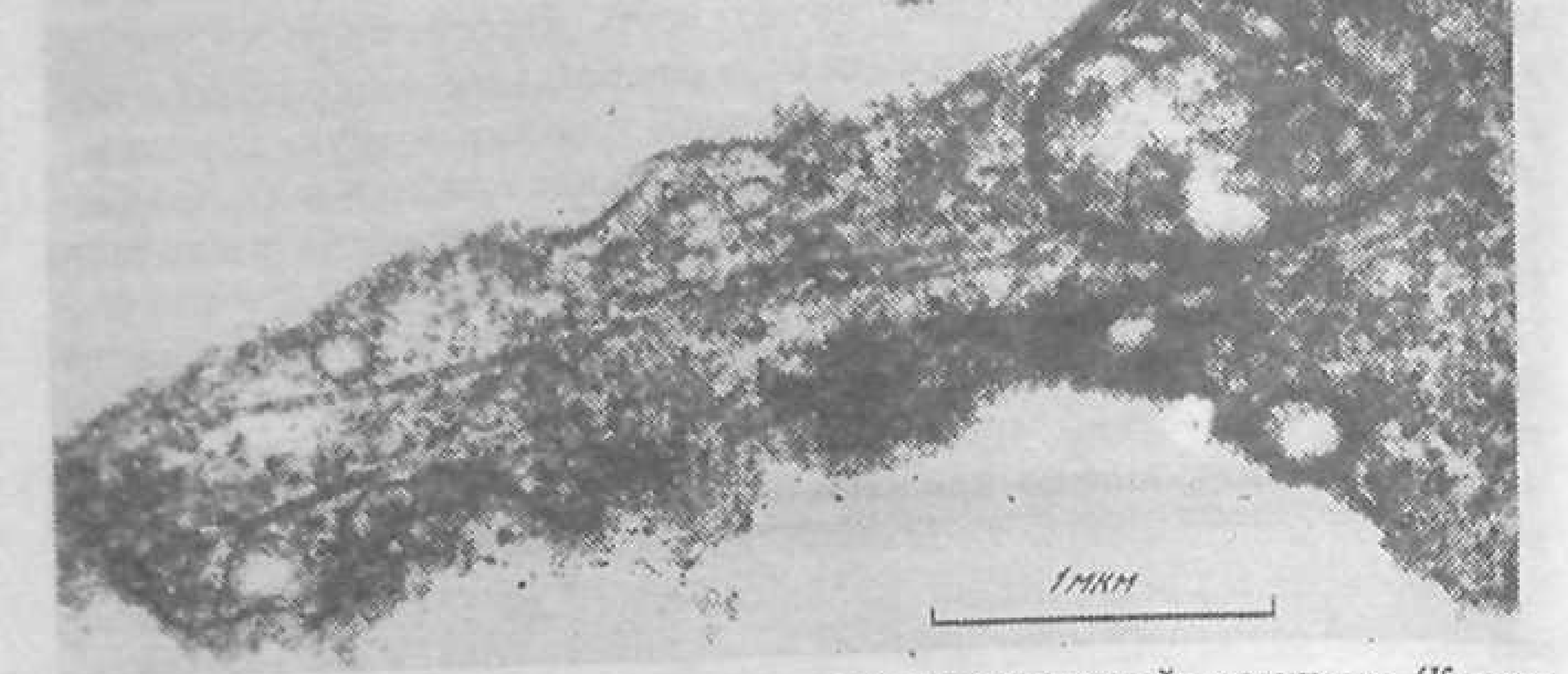


Рис. 74. Микротрубочки в синцитиальном тяже спикулогенной мезенхимы (Керкис, Исаева, неопубл.)

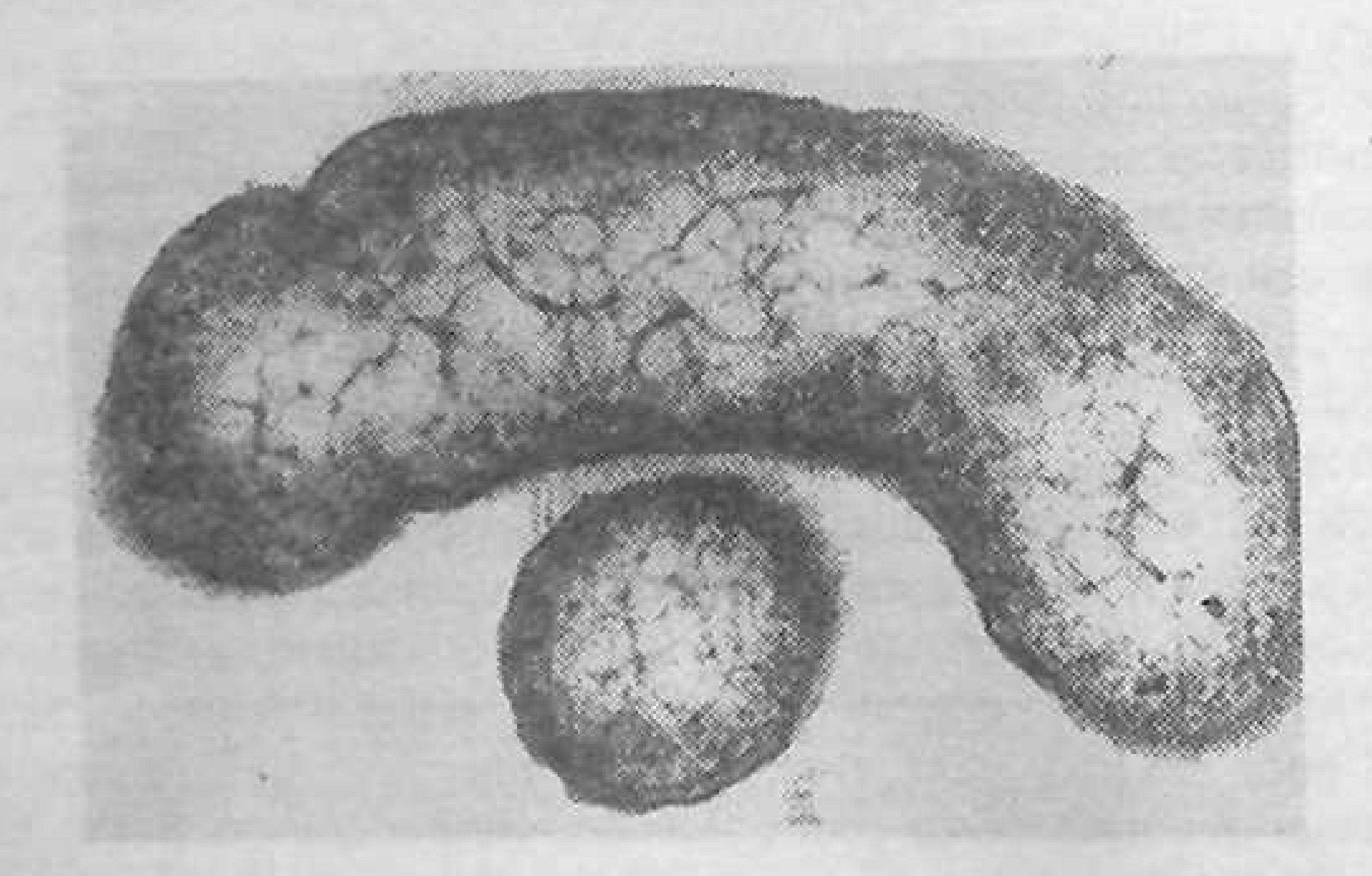


Рис. 75. Сетчатый цитоматрикс филоподиальных отростков синцития спикулогенной мезенхимы (Керкис, Исаева, неопубл.)

При ультраструктурном исследовании в цитоплазматических тяжах, соединяющих обособленные участки расчлененного спикулогенного синцития, найдены микротрубочки, расположенные вдоль оси цитоплазматического тяжа (рис. 74). В филоподиальных отростках спикулогенных клеток и синцитиев не обнаружено ясно выраженных пучков микрофиламентов; цитоскелет филоподий, как и основной массы цитоплазмы, представлен сетчатым цитоматриксом (рис. 75).

Окрашивание клеток первичной мезенхимы родаминфаллоидином выявило яркую флуоресценцию клеточных отростков как у биполярных (рис. 76, *a*), так и у мультиполярных клеток с множеством филоподий (рис. 76, *б*).

Обработка цитохалазином В (1–10 мкг/мл), примененная с самого начала культивирования, подавляет движение и слияние в синцитии

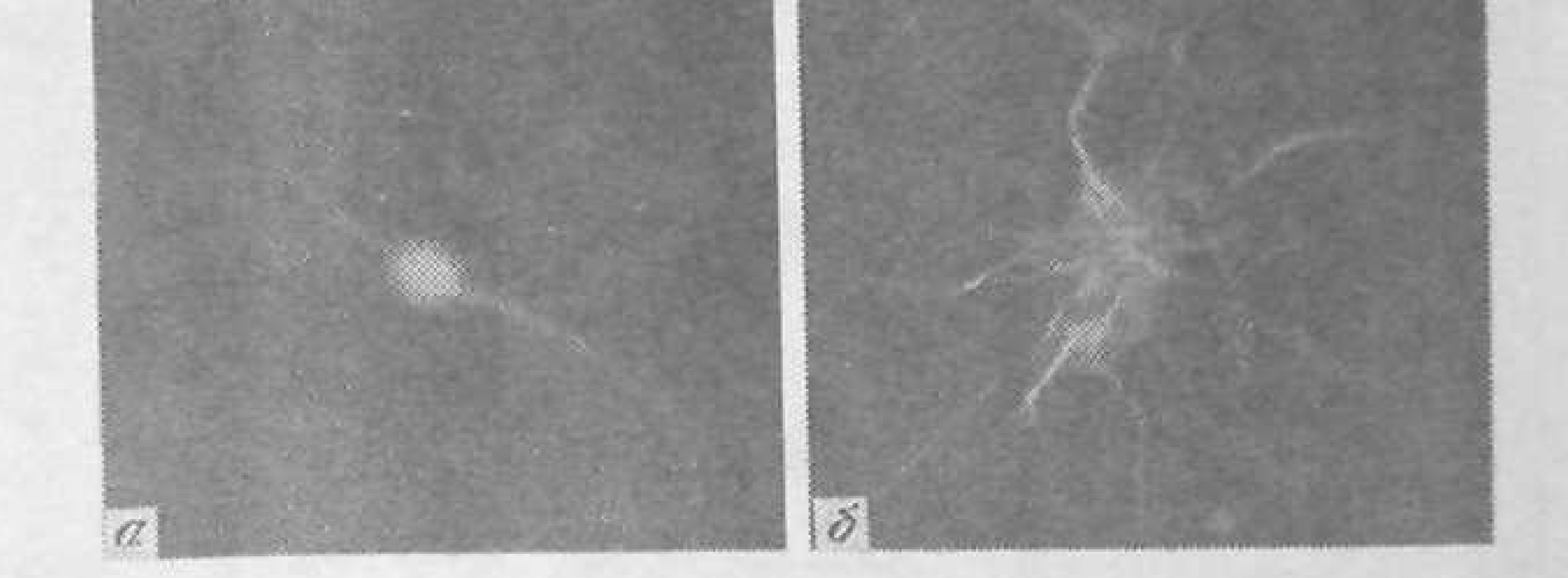


Рис. 76. Окрашивание родаминфаллоидином клеток первичной мезенхимы
а – биполярная клетка (12 ч культивирования); *б* – мультиполярная клетка (24 ч)

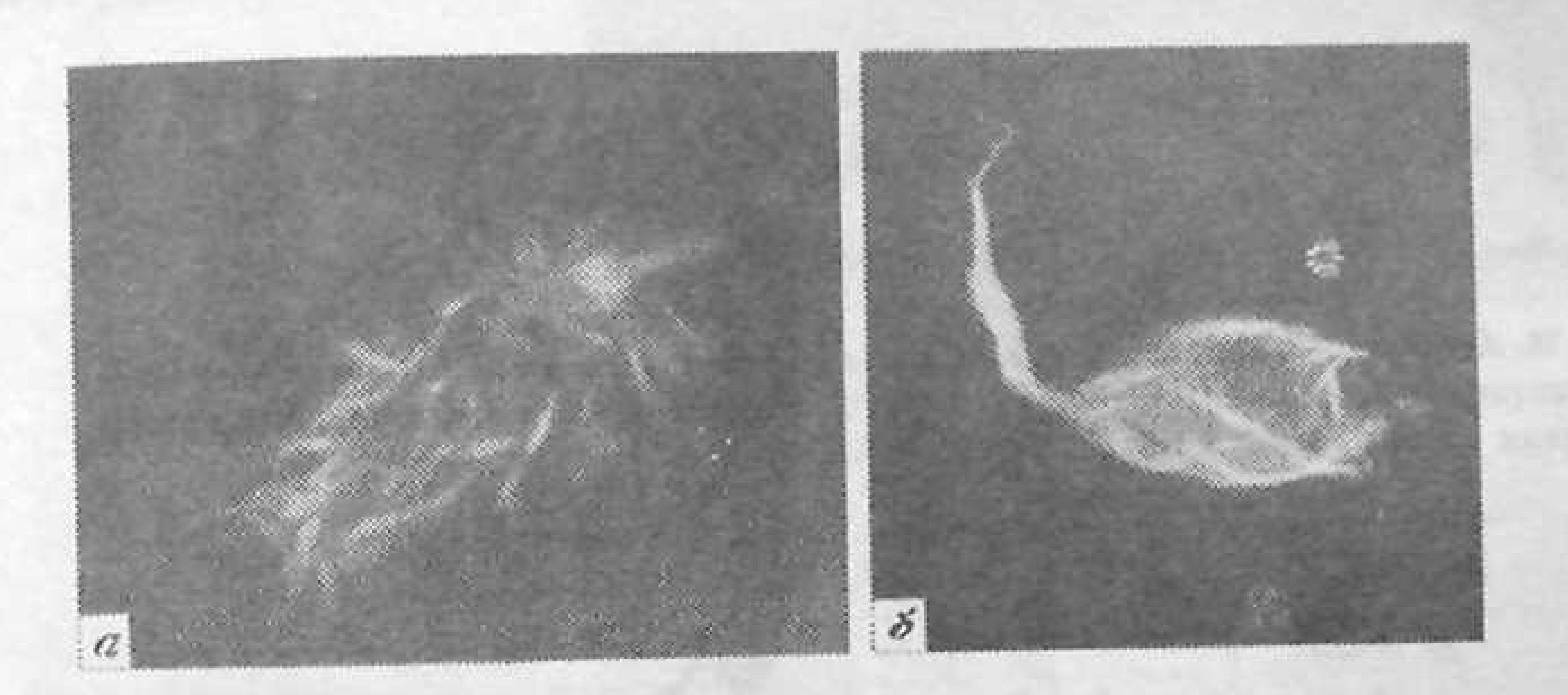


Рис. 77. Флуоресценция родаминфаллоидина через 1 мин (*а*) и 5 мин (*б*) после начала обработки мезенхимных синцитиев цитохалазином D (2 мкг/мл)

клеток первичной мезенхимы и полностью ингибирует спикулогенез. Обработка цитохалазином (1–10 мкг/мл) после 19–24 ч культивирования, когда уже образованы синцитиальные ансамбли и начался спикулогенез, вызывает быстрое, в течение нескольких минут, исчезновение филоподий – отростков, характерных для клеток первичной мезенхимы, коллапс симпластов (рис. 77), а также фрагментацию расчлененных синцитиев. В отмытых от цитохалазина культурах после обработки им в течение 10–15 мин (1–5 мкл/мл) иногда наблюдалось амебоидное движение потерявших обычную расчлененную форму и филоподии симпластов, в некоторых случаях с небольшой спикулой аберрантной формы (рис. 78).

Длительная, в течение 2–5 ч, обработка культур цитохалазином (1–5 мкл/мл) после начала спикулогенеза, начатая через 19–23 ч, приводит к образованию множества небольших кристаллов в форме сфер или многогранников. Форма возникших до применения ингибитора спикул становится неправильной: концы трехлучевой спикулы утолщаются и приобретают угловатую или округлую форму, появляются добавочные



Рис. 78. Амебоидная подвижность симпласта с аберрантной спикулой после воздействия цитохалазином В (1 мкг/мл, 15 мин) и последующей отмывки; интервалы между кадрами около 1 мин (Исаева, Чуриков, 1988б)

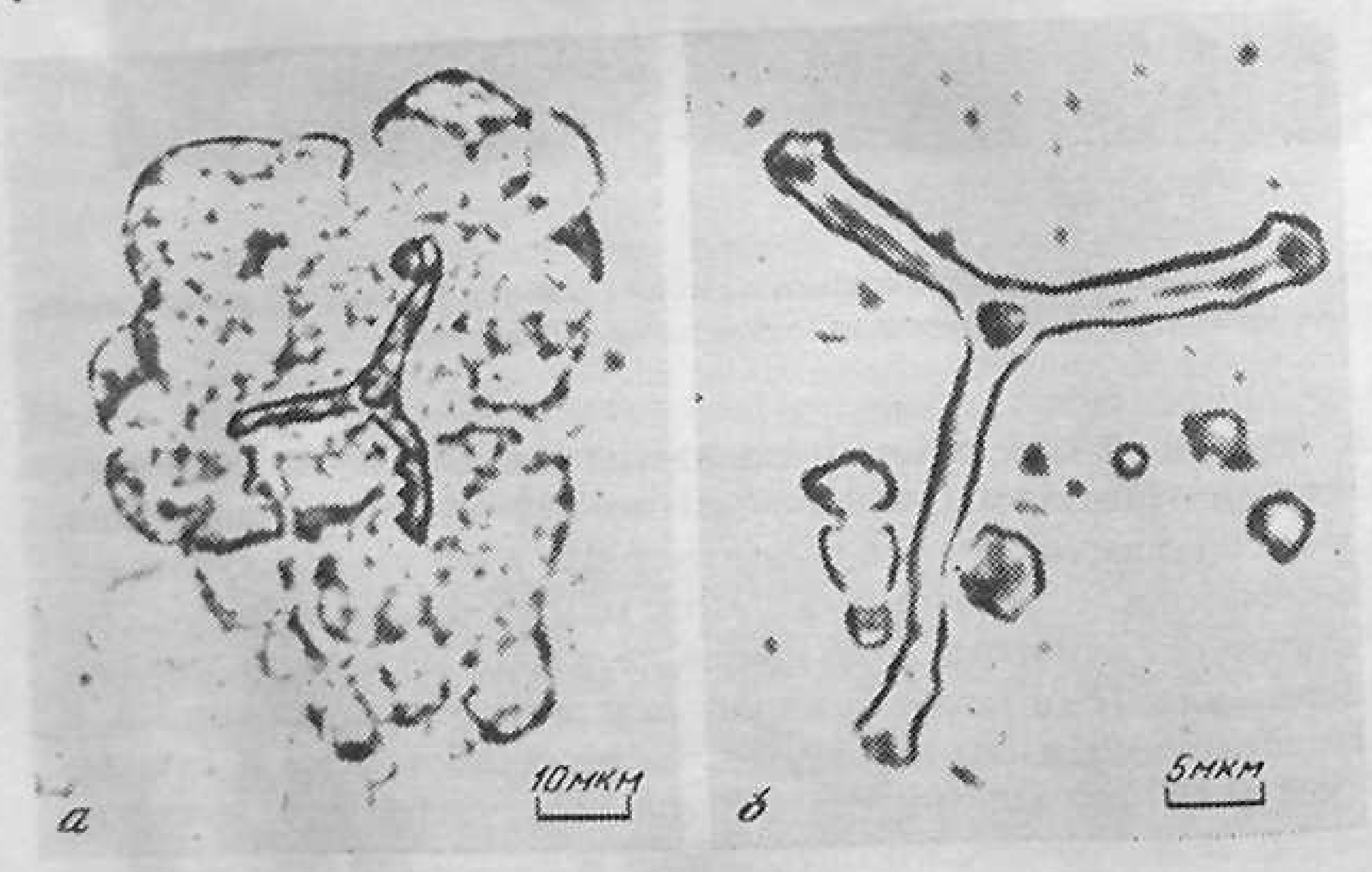


Рис. 79. Морфология спикулогенного симпласта *(а)* и спикул *(а, б)* после обработки цитохалазином В (Исаева, Чуриков, 1988б)

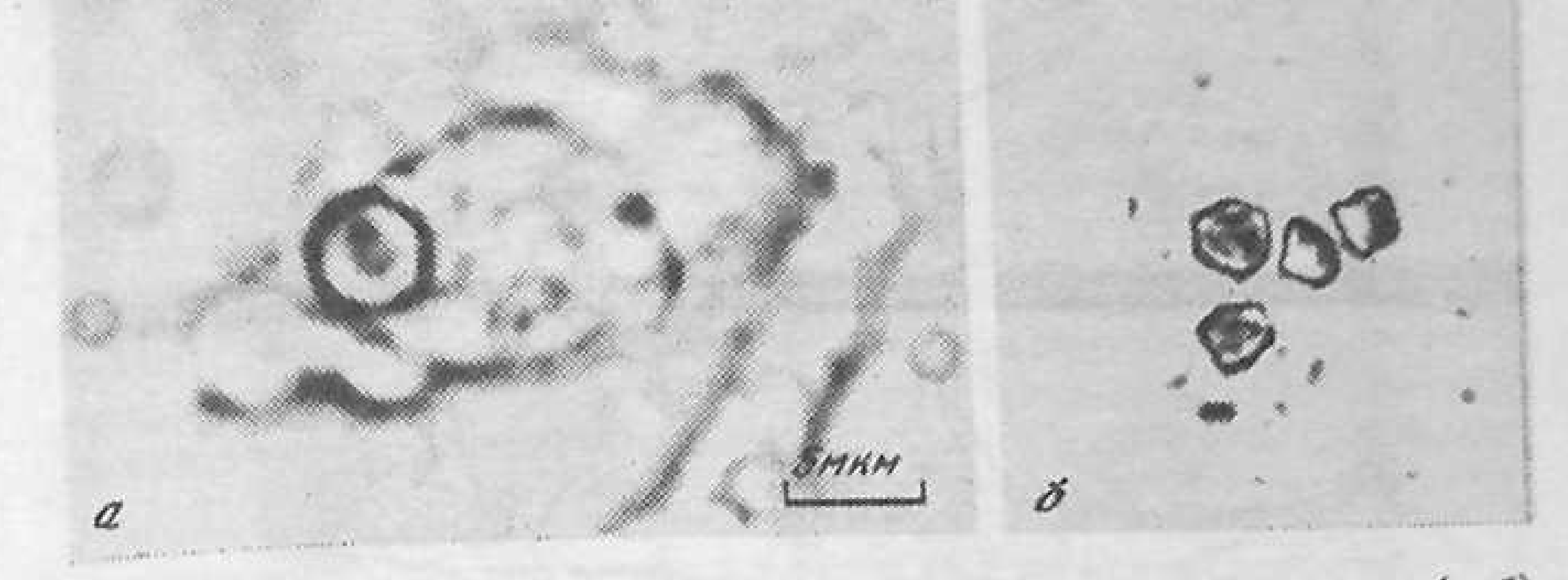


Рис. 80. Морфология спикулогенного симпласта *(а)* и грануловидных спикул *(а, б)* после обработки колхицином (10 мкг/мл)

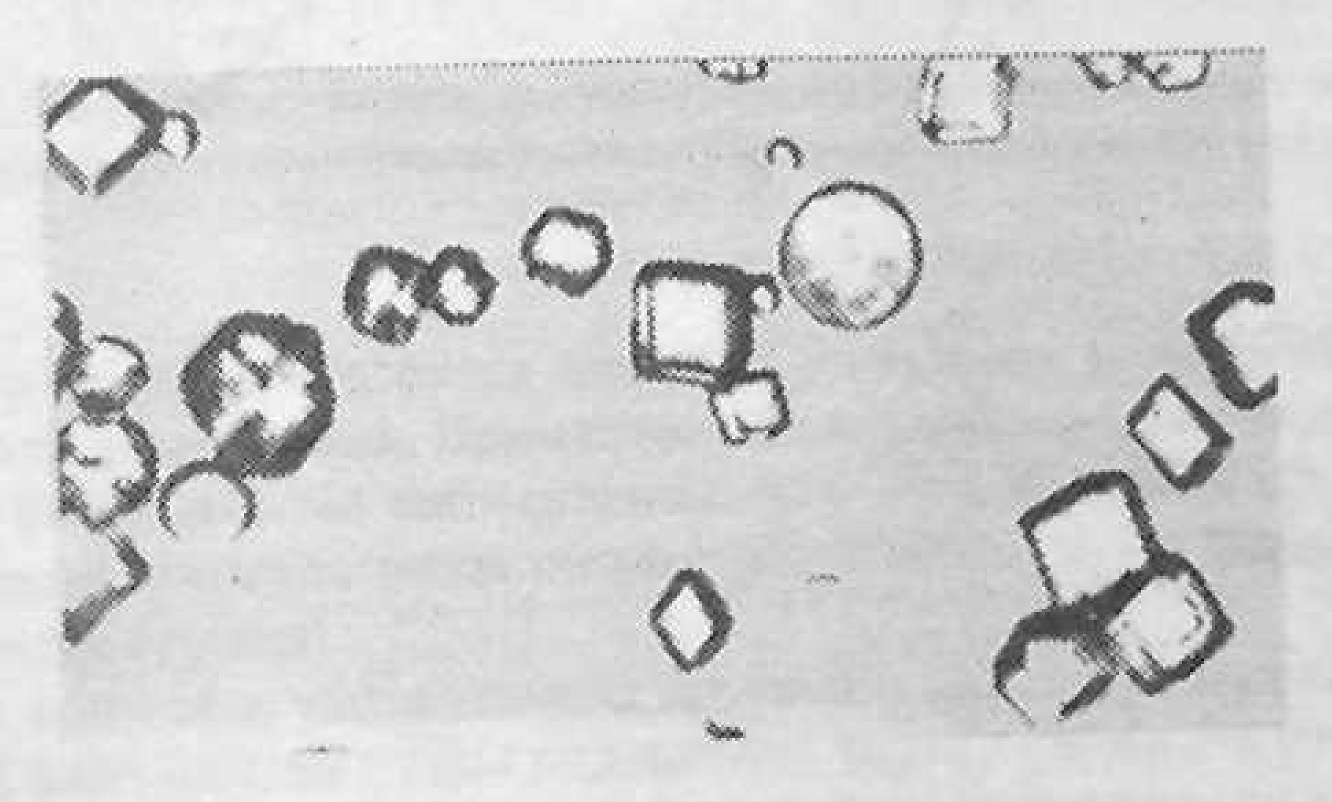


Рис. 81. Форма кристаллов кальцита при неорганической минерализации

гранулы кальцита вблизи предсуществовавшей спикулы (рис. 79), по-видимому, вследствие фрагментации синцитиального ансамбля.

Постоянное пребывание клеток первичной мезенхимы in vitro в растворе колцемида (5–10 мкг/мл) или колхицина (10–20 мкг/мл) ингибирует движение клеток, слияние их в синцитии и полностью подавляет процесс спикулогенеза. Применение колхицина в концентрации 5 мкг/мл с начала культивирования ведет к неполному подавлению спикулогенеза и появлению немногочисленных округлых гранул кальцита. Обработка колхицином (5–10 мкг/мл через 19–24 ч в течение 5–7 ч) культур с уже начавшимся спикулогенезом приводит к потере расчлененности синцитиальных ансамблей вследствие их фрагментации и коллапса. Продуцируемые такими симпластами гранулярные спикулы чаще всего имеют сферическую или многогранную форму (рис. 80).

Сферические и многогранные формы кристаллов кальцита, продуцируемых в клеточной культуре при воздействии ингибиторов, сходны с формами кристаллов углекислого кальция, возникающими в морской воде при неорганической кристаллизации в результате реакции между углекислым калием и хлористым кальцием (рис. 81). При обработке

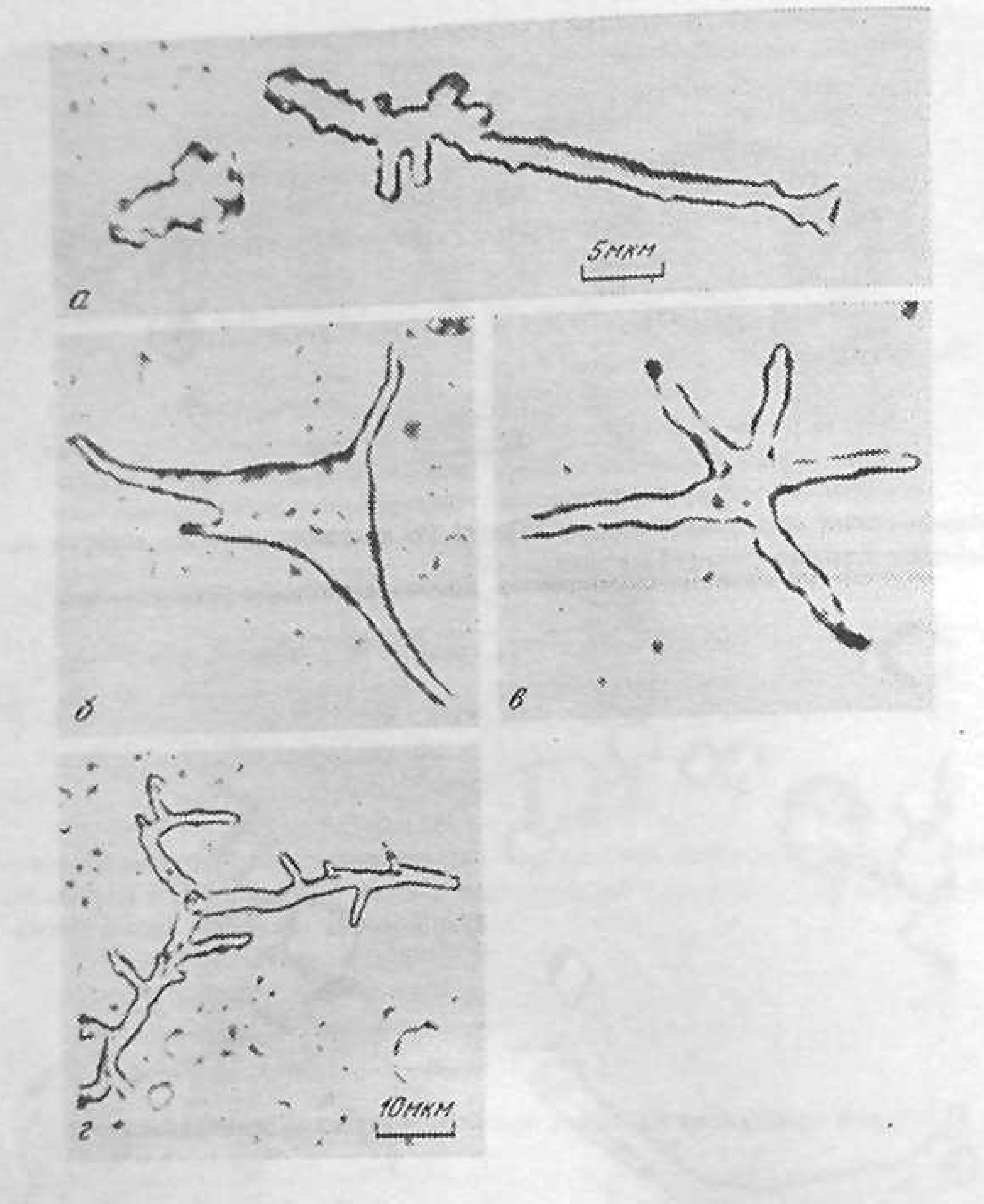


Рис. 82. Аберрантная морфология спикул после обработки клеточной культуры колхицином

а, б – 10 мкг/мл, с 21 по 27 ч; *в, г* – 5 мкг/мл, с 19 по 26 ч (Исаева, Чуриков, 1988б)

колхицином ранее появившиеся в трехмерных клеточных агрегатах спикулы продолжали расти, приобретая аберрантную форму. Длительное применение относительно низкой концентрации колхицина (5 мкг/мл) приводило к росту предсуществовавших в клеточных агрегатах спикул в виде причудливых образований с множественными отростками (рис. 82).

После длительной обработки цитохалазином или колхицином правильные трехлучевые спикулы в спикулогенных культурах были редкостью, тогда как в контрольных необработанных культурах преобладали трехлучевые спикулы, сходные со спикулами эмбриона на стадии гаструлы.

В тех же культурах при любой длительности обработки (с самого начала культивирования) цитохалазином (1–2 мкг/мл) или колхицином (5–10 мгк/мл) наблюдалась дифференциация пигментных клеток (рис. 83), для которых и в норме весьма обычна близкая к сферической форма.

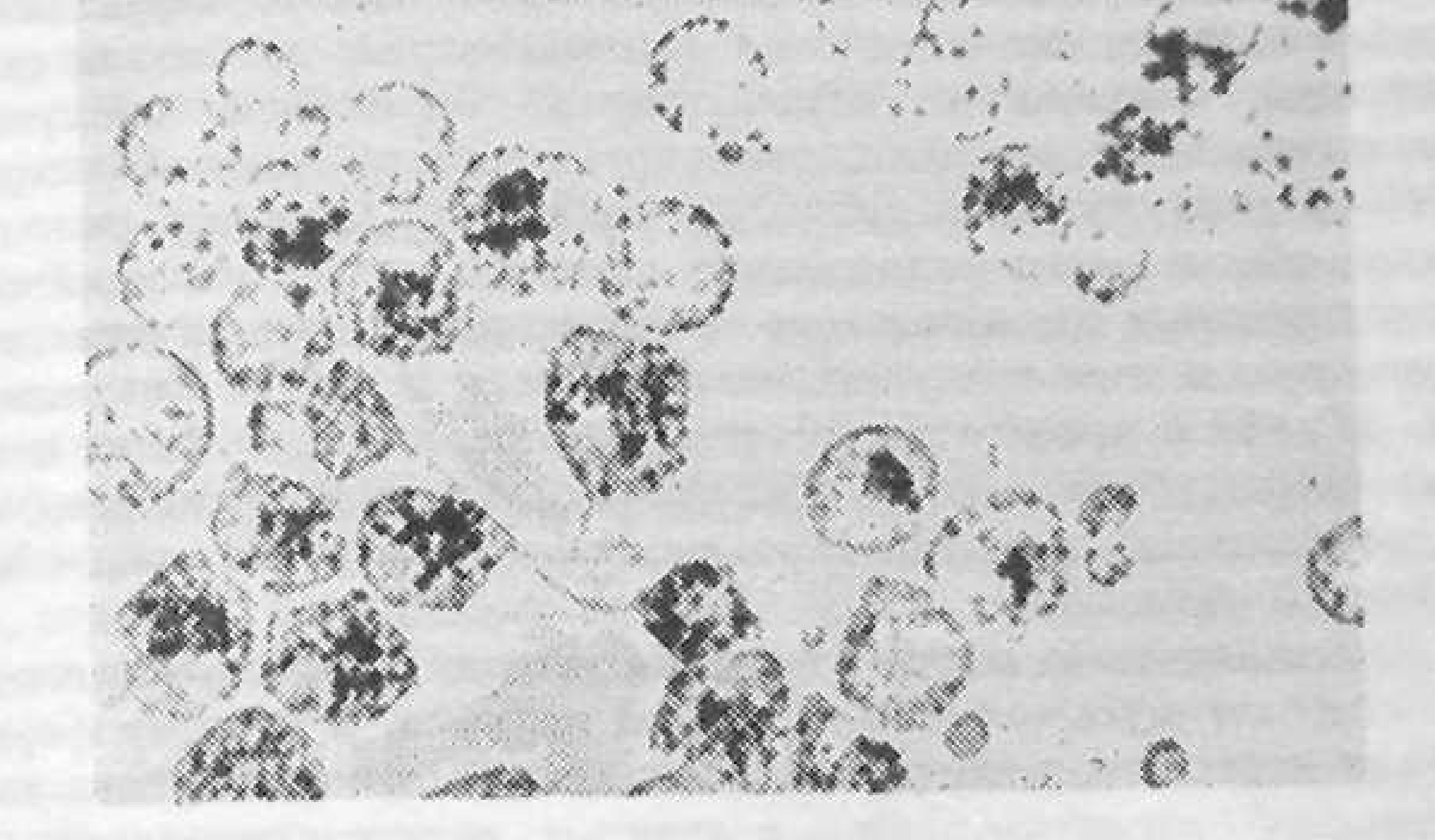


Рис. 83. Пигментные клетки в культуре, дифференцировавшиеся при непрерывной инкубации в растворе цитохалазина В (2 мгк/мл) в течение 24 ч с начала культивирования

Маркером пигментогенеза служило появление и накопление красного пигмента эхинохрома. Применение более высоких концентраций ингибиторов (5–10 мкг/мл цитохалазина или 20–50 мкг/мл колхицина) лишь несколько снижало долю пигментных клеток по сравнению с контрольными культурами.

Как известно, цитохалазины нарушают нормальную организацию актиновых филаментов путем подавления полимеризации их на быстрорастущем конце (см. гл. I). Микрофиламенты и их пучки (или сети) найдены в отростках клеток первичной мезенхимы и синцитиев (Tilney, Gibbins, 1969; Katow, Solursh, 1980). Показано, что обработка цитохалазином вызывает быстрое (в течение нескольких минут) исчезновение филоподий, с помощью которых клетки первичной мезенхимы прикрепляются к субстрату, перемещаются по нему и устанавливают межклеточные соединения (Karp, Solurch, 1985 b). Обнаружено, что экспрессия гена цитоплазматического актина происходит во время выселения клеток первичной мезенхимы в бластоцель (см.: Angerer, Davidson, 1984; Davidson, 1989), а синтез этими клетками ряда специфических и неспецифических белков, в том числе актина, – во время цитодифференцировки (Harkey, Whiteley, 1982), причем диссоциация клеток не изменяет качественного паттерна синтезируемых белков, модифицируя его лишь количественно, и в частности усиливая синтез актина (Maglot, 1985). Обработанные цитохалазином синцитиальные ансамбли теряли свою расчлененную морфологию, превращаясь в компактные симпласты неправильной формы. Наблюдаемая иногда подвижность обработанных цитохалазином и затем отмытых от него симпластов, как мы предполагаем, обусловлена разрушением ригидной цитоскелетной сети актиновых филаментов и взаимодействия их с миозином – подобно вызываемой воздействием цитохалазина амебоидной подвижности яиц морского ежа (см. гл. I).

Колхицин и колцемид, вызывающие, как известно, разрушение микротрубочек путем подавления их полимеризации, оказывали сходное с эффектом цитохалазина воздействие на морфологию спикулогенных синцитиев. Микротрубочки клеток первичной мезенхимы (Katow, Solursh, 1980) и спикулогенных синцитиев эмбрионов морского ежа, по-видимому, обеспечивают поддержание сложной трехмерной архитектоники спикулогенных ансамблей и процессы направленного внутриклеточного транспорта в ходе спикулогенеза (Gibbins et al., 1969). Колхицин (10^{-2}–10^{-5} М), как и высокое гидростатическое давление, вызывал исчезновение микротрубочек и потерю прежней расчлененной морфологии, коллапс и фрагментацию синцития первичной мезенхимы в организме эмбриона (*Tilney, Gibbins, 1969*).

Кристаллическая спикула на ранних этапах ее роста оказывается как бы слепком огромной спикулогенной вакуоли, и поэтому форма ее в общих чертах определяется архитектоникой синцитиального ансамбля первичной мезенхимы. При различных экспериментальных воздействиях, влияющих на пространственное расположение клеток первичной мезенхимы in vivo, прослеживается корреляция между архитектоникой спикулогенных ансамблей и формой продуцируемых ими спикул (Prenant, 1926; Okazaki, 1962). Инкубация эмбрионов в искусственной морской воде с десятикратно уменьшенным содержанием кальция и магния приводила к фрагментации и округлению спикулогенных синцитиев и возникновению в них кристаллов в форме многогранников, а при продолжении роста предсуществовавших трехлучевых спикул – к появлению многогранных поверхностей на концах спикулы (Okazaki, 1962).

Обработка цитохалазином или колхицином, нарушая нормальную архитектонику спикулогенных симпластов, приводит к минерализации либо по неорганическому типу (подобно эффекту, вызванному уменьшением концентрации кальция и магния в воде – см.: Okazaki, 1962), либо с появлением аберрантных спикул причудливой формы. Универсальными чертами биоминерализации у различных типов животных являются способность концентрировать ионы из цитозоля в специализированных вакуолях и контроль биоминерализации (нуклеации и ориентации кристалла, ограничений его роста) органическим матриксом (Wilbur, 1984). Процесс биоминерализации при возникновении и росте личиночной спикулы морского ежа *осуществляется* посредством *своеобразной* "секреции внутрь", т.е. направленного к спикулогенной вакуоли – гомологу внеклеточного пространства – транспорта с отложением органического материала внутри вакуоли (Керкис, Исаева, 1984). И процессы внутриклеточного транспорта, и общая архитектоника клетки, как известно, *организуются элементами* цитоскелета. Воздействие относительно высокими концентрациями ингибиторов, нарушающих нормальную морфофункциональную организацию цитоскелета, по-видимому, существенным образом повреждает механизмы контроля биоминерализации при поддержании функционирующими лишь механизмы транспорта ионов *кальция*. В итоге минерализация идет по неорганическому типу.

И многогранники (ромбоэдр как одна из форм), и сферические кристаллы *углекислого кальция могут возникать при неорганической кристаллизации* (Шаскольская, 1976; Елисеев, 1983). Нелинейные – сферические и дендритные – формы кристаллов в неживой природе появляются в условиях неравновесного роста при физико-химической гетерогенности среды (Елисеев, 1983). Вероятно, при биоминерализации анизотропия *организации органического матрикса спикулогенной вакуоли*, контролирующая органическую кристаллизацию в одних направлениях и преимущественный рост кристалла в других, в свою очередь определяется морфофункциональной архитектоникой цитоскелета синцитиального ансамбля. При действии относительно небольших концентраций ингибиторов, *вероятно, нарушаются, но не полностью* выключаются механизмы контроля роста спикулы, что и приводит к развитию аберрантных форм спикул.

Таким образом, при различных экспериментальных воздействиях выявлена преемственность пространственной организации клеточных ансамблей первичной мезенхимы и продуцируемых ими спикул личиночного скелета и в организме эмбриона, и в культуре эмбриональных клеток морского ежа. Морфология спикул детерминируется цитоархитектоникой спикулогенных ансамблей; интактный цитоскелет – необходимое условие нормальной экспрессии спикулогенеза, поскольку именно морфофункциональная организация цитоскелета контролирует и векторизует внутриклеточный транспорт и определяет цитоархитектуру. Воздействие ингибиторами, нарушающими морфофункциональную организацию цитоскелета, существенным образом повреждает механизмы контроля биоминерализации.

Исследование спикулогенеза in vivo и in vitro выявляет зависимость числа, расположения, размера и формы спикул от пространственного распределения клеток первичной мезенхимы и архитектоники формируемых ими спикулогенных синцитиальных ансамблей. Преемственность пространственных паттернов одноядерных мезенхимных клеток, многоядерных синцитиев (или симпластов) и морфологии спикул – проявление эпигенетической памяти надклеточных систем в ходе морфогенеза (см. гл. VI). В морфологии скелетных структур как бы записывается, в буквальном смысле окаменевает история морфогенеза спикулогенных клеточных *ансамблей*, будь то в нормальном эмбриональном развитии или в экспериментально измененных условиях.

В спикулогенной клеточной культуре наблюдается полноценная цитодифференцировка, прекрасным маркером которой на ультраструктурном уровне являются центры кальцификации и спикулогенные вакуоли; *конечным проявлением цитодифференцировки служит* образование скелетных спикул. Однако в условиях in vitro отсутствуют факторы, контролирующие в организме зародыша численность и пространственную упорядоченность мезенхимных клеток, что приводит к вариабельности морфологии спикулогенных синцитиев, симпластов и продуцируемых *ими спикул. В спикулогенной культуре возможна биоминерализация* в одноядерной спикулогенной клетке, т.е. нарушение нормальной после-

довательности этапов слияния клеток и минерализации, разобщение этих двух проявлений специфической цитодифференцировки. В условиях культивирования наблюдаются и нарушения пространственной организации спикулогенной мезенхимы с возникновением массивных нерасчлененных симпластов и множества центров кальцификации. Однородная повышенная адгезивность искусственного субстрата ведет к вариабельности и неупорядоченности морфологии и размеров синцитиев, распластыванию клеток и синцитиев с образованием ламеллоподий, возникновению массивных симпластов. Искусственно созданная неоднородность адгезивности субстрата вызывает преимущественное прикрепление и перемещение первичномезенхимных клеток и синцитиев по участкам более высокой адгезивности. Все эти нарушения нормальной морфологической экспрессии программы спикулогенеза – следствие получения спикулогенными клетками аномальной позиционной информации.

Позиционную информацию (Wolpert, 1969, 1970, 1985, 1989), определяющую морфогенетические перемещения клеток первичной мезенхимы и их локализацию к началу спикулогенеза в ходе нормального эмбрионального развития, несут, по-видимому, специфические лигандные молекулы внеклеточного матрикса базальной пластинки (см. выше). Специфичность же клеточной реакции на эти позиционные сигналы детерминируется набором рецепторов клеточной поверхности. Поскольку клетки спикулогенной линии морского ежа способны к автономной экспрессии программы специфических синтезов, все нарушения реализации нормальной пространственной программы спикулогенеза (и морфологии спикул в итоге) в различных экспериментальных условиях определяются, по-видимому, позиционной информацией, получаемой спикулогенными клетками в экспериментальных системах. Так, в среде с добавлением сыворотки крови на искусственном субстрате (стекле или пластике) адсорбируются лигандные молекулы (например, *фибронектин*); такой субстрат, очевидно, обладает высокой адгезивностью для спикулогенных клеток, распластывающихся на нем с образованием ламеллярных форм.

Определяемый позиционными сигналами пространственный паттерн клеток первичной мезенхимы детерминирует архитектонику спикулогенных синцитиальных ансамблей, возникающих путем слияния отростков мезенхимных клеток. После образования синцития его архитектоника оказывается носителем позиционной информации, транслируемой в процессе спикулогенеза в пространственный паттерн спикулы. Таким образом, реакции клетка–субстрат и клетка–клетка выполняют ключевую морфогенетическую роль в ходе спикулогенеза.

Глава IV

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ КОНТАКТНЫХ РЕАКЦИЙ КЛЕТКА–КЛЕТКА И КЛЕТКА–СУБСТРАТ В МИОГЕНЕЗЕ IN VITRO

Образование скелетно-мышечных волокон у позвоночных животных – пример терминальной цитодифференциации, опосредованной в ходе эмбриогенеза цепью последовательных событий и сопряженной с экспрессией сложного комплекса специфических признаков. У зародыша, уже прошедшего гаструляцию и нейруляцию, прилежащая к хорде и нервной трубке масса мезодермальных клеток сегментируется формированием парных сомитов, разные участки которых дают разные производные, и в частности клеточной материал миотома – скелетную мускулатуру. Клетки миотома мигрируют в медиолатеральном направлении, значительная часть их перемещается в зачатки конечностей. Мигрирующие миогенные клетки вытянуты по направлению их движения; направляющими миграцию клеток ориентирами субстрата, по-видимому, служат коллагеновые фибриллы и, возможно, другие структурные компоненты внеклеточного матрикса, расположение которых обеспечивает контактное направление движения клеток (Jacob et al., 1979). В развивающейся почке конечности миогенные клетки также проявляют высокую инвазивность и мигрируют в проксимодистальном направлении, причем для направленной миграции этих клеток необходимо присутствие апикального эктодермального гребня почки конечности, возможно синтезирующего некий хемотактант (Gumpel-Pinot et al., 1984; Lee, Ede, 1989); помимо того, для нормальной пространственной организации мышц конечности необходимо влияние соединительной ткани и компонентов внеклеточного матрикса (см.: Lee, Ede, 1989).

Детально исследованы конечные этапы миогенеза главным образом на культурах миогенных клеток. Техника культивирования in vitro скелетно-мышечных миобластов была разработана Конигсбергом (Konigsberg, 1965, 1979), и с тех пор миогенные культуры клеток птиц и млекопитающих широко используются в качестве модельной системы для исследования цитодифференциации. В ходе миогенеза in vitro проявляются все морфологические, физиологические и биохимические характеристики дифференцированного мышечного волокна (обзоры: Фридлянская, 1981; Pearson, 1980; Inestrosa, 1982; Turner, 1986). При нормальной дифференцировке скелетно-мышечного волокна как в организме, так и в условиях однослойной культуры морфологические признаки зрелого волокна проявляются поэтапно в определенной последовательности: после периода репродукции одноядерных миобластов осуществляются их слияние (см.: Румянцев, Ерохина, 1981; Holtzer et al., 1984; Konigsberg, Pfister, 1986; Knudsen, 1990) и затем миофибриллогенез с характерным паттерном

экспрессии специфичных для скелетной мышцы изоформ сократительных белков (см.: Fischman, 1982; Holtzer et al., 1984; Sanger et al., 1984; Hayward, Schwartz, 1986; Stockdale, Miller, 1987; Hartley et al., 1991).

Переключение от *клеточной* репродукции, контролируемой пептидными факторами роста, к реализации программы миогенеза осуществляется специфическими миогенными регуляторными факторами, связывающимися с *регуляторными сайтами* ДНК и активирующими транскрипцию специфического набора генов мышечных белков либо опосредованно влияющих на экспрессию генов (см.: Olson et al., 1991). Таким образом, уникальные регуляторные *гены могут* контролировать *детерминацию* клеток миогенной линии (см.: Blau, 1988; Olson et al., 1991). Затем уже реализация мышечной дифференцировки определяется специфическим пространственно-временным *паттерном генной экспрессии* (см.: Strohmann, Wolf, 1985).

В ходе дифференциации скелетно-мышечных клеток происходит существенная перестройка клеточной и субклеточной архитектуры, вовлекающая мембранные системы (Kalderon, Gilula, 1979; Kaufman, Foster, 1985; Knudsen, 1985) и опорно-сократительный аппарат клетки. Слияние миобластов опосредовано межклеточной адгезией, зависящей от появления специфических гликопротеинов поверхности, в том числе молекул клеточной адгезии N-CAM и N-cadherin (Knudsen, 1990; Knudsen et al., 1990 a,b; Bloch, 1992). Эти молекулы – представители супергенного семейства иммуноглобулинов с множеством изоформ, возникающих как продукт одного гена, и посредники гомотипической адгезии клеток, прежде всего нервных (Edelman, 1987; Cunningham et al., 1987; Rutishauser et al., 1988).

Цитоскелет одноядерных миобластов организован подобно цитоскелету немышечных клеток. После слияния миобластов в миосимпласты осуществляется обширная реорганизация всей цитоскелетной сети и отдельных ее элементов: микротрубочек, промежуточных филаментов и актиновых филаментов с формированием типичной для миотубы ультраструктуры (Bennett et al., 1979; Pudney, Singer, 1979; Holtzer et al., 1981; Price, Singer, 1983; Singer, Pudney, 1984; Tassin et al., 1985; Antin et al., 1986).

Итак, история развития миогенной клеточной линии, ее детерминация и дифференцировка в скелетно-мышечные волокна включают как взаимодействие мигрирующих клеток с *внеклеточным матриксом*, так и межклеточные взаимодействия в процессе цитодифференциации. Более того, на клетках зародышей шпорцевой лягушки получены прямые экспериментальные доказательства *невозможности автономной*, не зависящей от межклеточных взаимодействий экспрессии мышечной дифференциации, необходимости клеточных контактов для активации мышечно-специфичных генов *альфа-актина* (Sargent et al., 1986).

МОДУЛЯЦИИ ФЕНОТИПА МИОГЕННЫХ КЛЕТОК В ОДНОСЛОЙНОЙ КУЛЬТУРЕ

Сравнительно простые и экспериментально контролируемые условия клеточной культуры делают ее удобной системой для исследования реакций клетка–субстрат и клетка–клетка. Использовали первичную культуру миогенных клеток бедренной мышцы куриного эмбриона, получаемую по модифицированной методике Конигсберга (Konigsberg, 1960; Исаева, 1979, 1980б).

В однослойной культуре в среде с эмбриональным экстрактом наблюдалась типичная картина миогенеза (Konigsberg, 1960; Bischoff, Holtzer, 1969: миграция одноядерных миобластов (рис. 84), репродукция их с последующим выходом из митотического цикла и слиянием в удлиненные миосимпласты, дифференцирущиеся в миотубы с поперечной исчерченностью, способные к спонтанным сокращениям в условиях культуры.

Индекс *слияния миобластов* в такой культуре достигает приблизительно 50% (Керкис, Исаева, 1981а). Полноценная экспрессия мышечной дифференциации и развитие миотуб с типичной организацией саркомеров, однако, сочетается в однослойной культуре с нарушениями характерного для организма пространственного паттерна миогенеза: миотубы располагаются на поверхности субстрата неупорядоченно, ветвятся и пересекают друг друга (рис. 85). Помимо миотуб типичной удлиненной формы, в однослойной миогенной культуре возникают распластанные по поверхности субстрата атипичные миосимпласты в виде обширных многоядерных ламелл мультиполярной или треугольной формы (рис. 86, *а*). Если в типичных трубковидных миосимпластах (миотубах) появляющаяся по мере их дифференцировки исчерченность оказывается именно поперечной, т.е. перпендикулярной оси мышечной трубки, то в плоских мультиполярных миосимпластах и пространственный паттерн исчерченности становится неупорядоченным (рис. 86, *б*).

Для однослойной миогенной культуры характерно последовательное, "тандемное" расположение миобластов, т.е. возникновение цепей или тяжей, в которых миобласты контактируют друг с другом своими длинными концевыми отростками (см. рис. 84). Появление таких тяжей предшествует слиянию миобластов в линейно вытянутые миосимпласты, преобразующиеся в миотубы. Биполярные веретеновидные миобласты, контактируя одним концом с соседней клеткой, на своем свободном конце образуют "поисковую" ундулирующую ламеллоподию (см. рис. 84). Столь же типична для миобластов и взаимная параллельная ориентация "бок о бок".

Локальная параллельная самоорганизация миобластов особенно выражена при культивировании миогенных клеток в среде без эмбрионального экстракта, когда слияние миобластов в миосимпласты подавлено и в слое миогенных клеток выделяются "потоки" расположенных параллельными рядами миобластов, ориентация же отдельных потоков различна (рис. 87, *а*). Индекс слияния клеток в культуре без эмбрионального



Рис. 84. Взаимная контактная ориентация одноядерных миобластов куриного зародыша в однослойной культуре

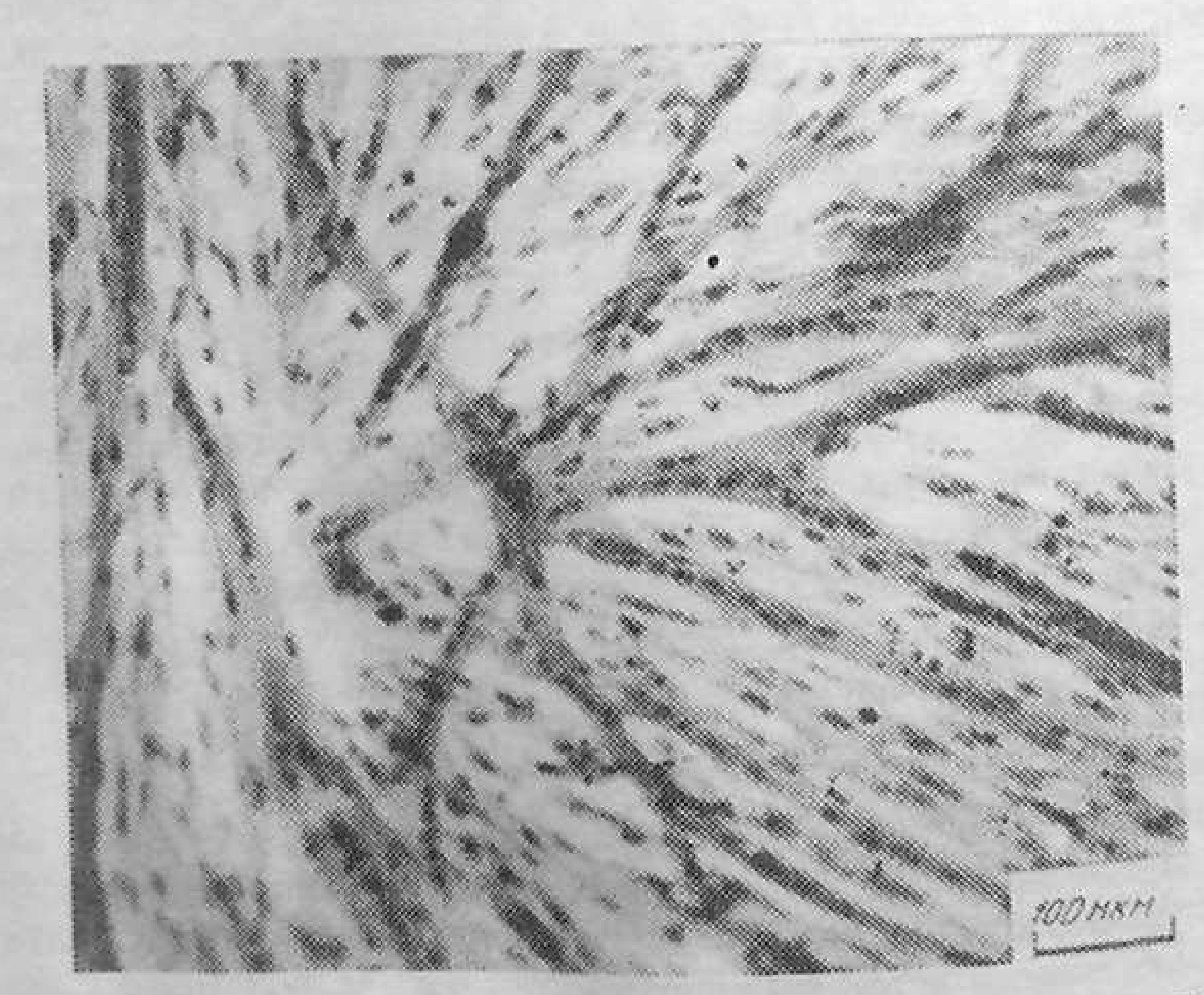


Рис. 85. Пространственная организация миотуб в однослойной миогенной культуре на изотропном субстрате

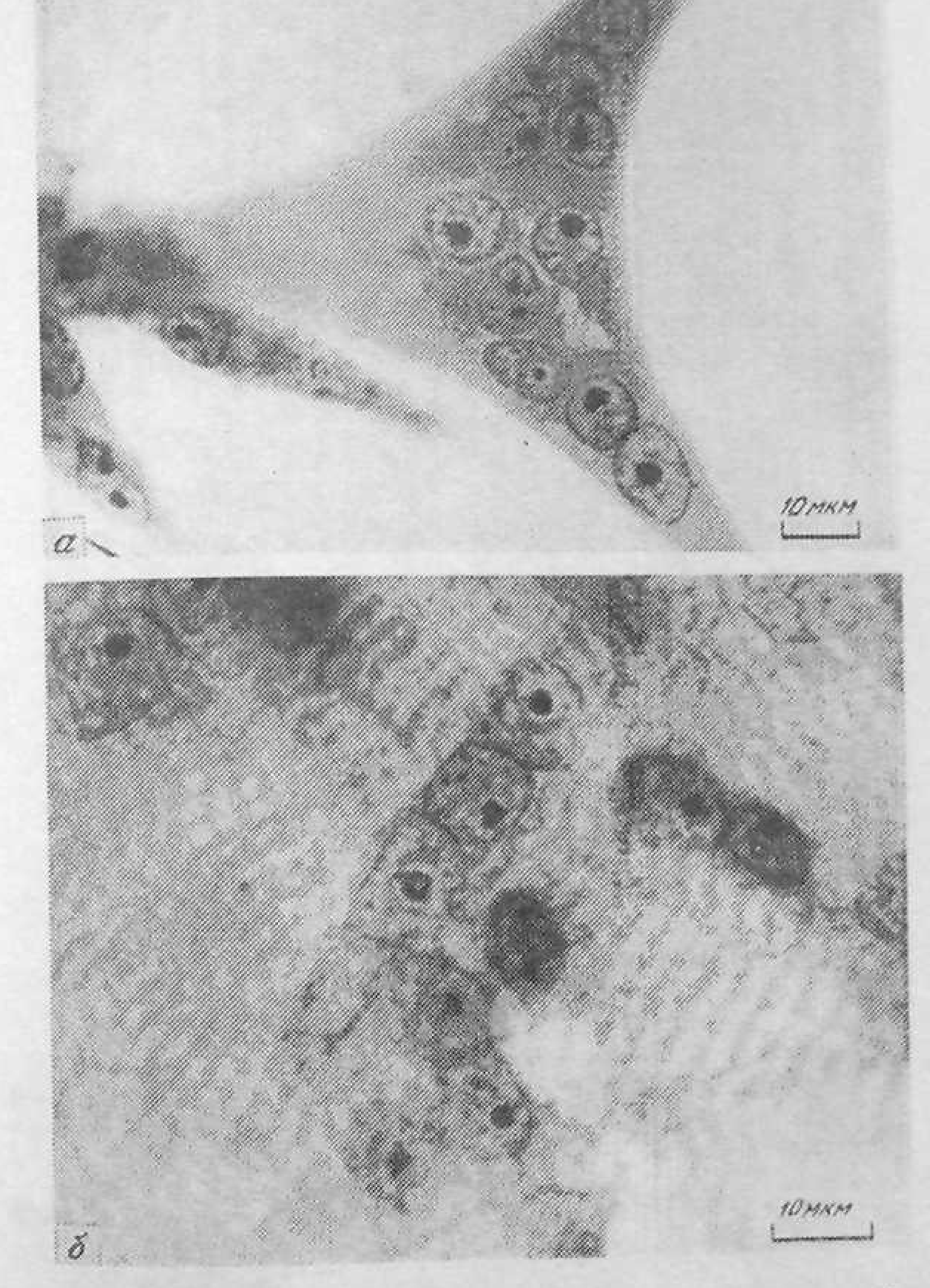


Рис. 86. Ламеллярные мультиполярные симпласты в однослойной миогенной культуре (*а, б*); аберрантный неоднородный паттерн исчерченности (*б*)

экстракта равен 6% и клеточная популяция представлена в основном клетками, морфологически неотличимыми от фибробластов (см. ниже).

Если через 4–5 сут роста культуры на "бедной" среде ее заменить средой с эмбриональным экстрактом, то через 4 сут после смены среды появляются многочисленные миотубы и индекс слияния достигает 40%. При этом предшествующий паттерн пространственной организации одно-

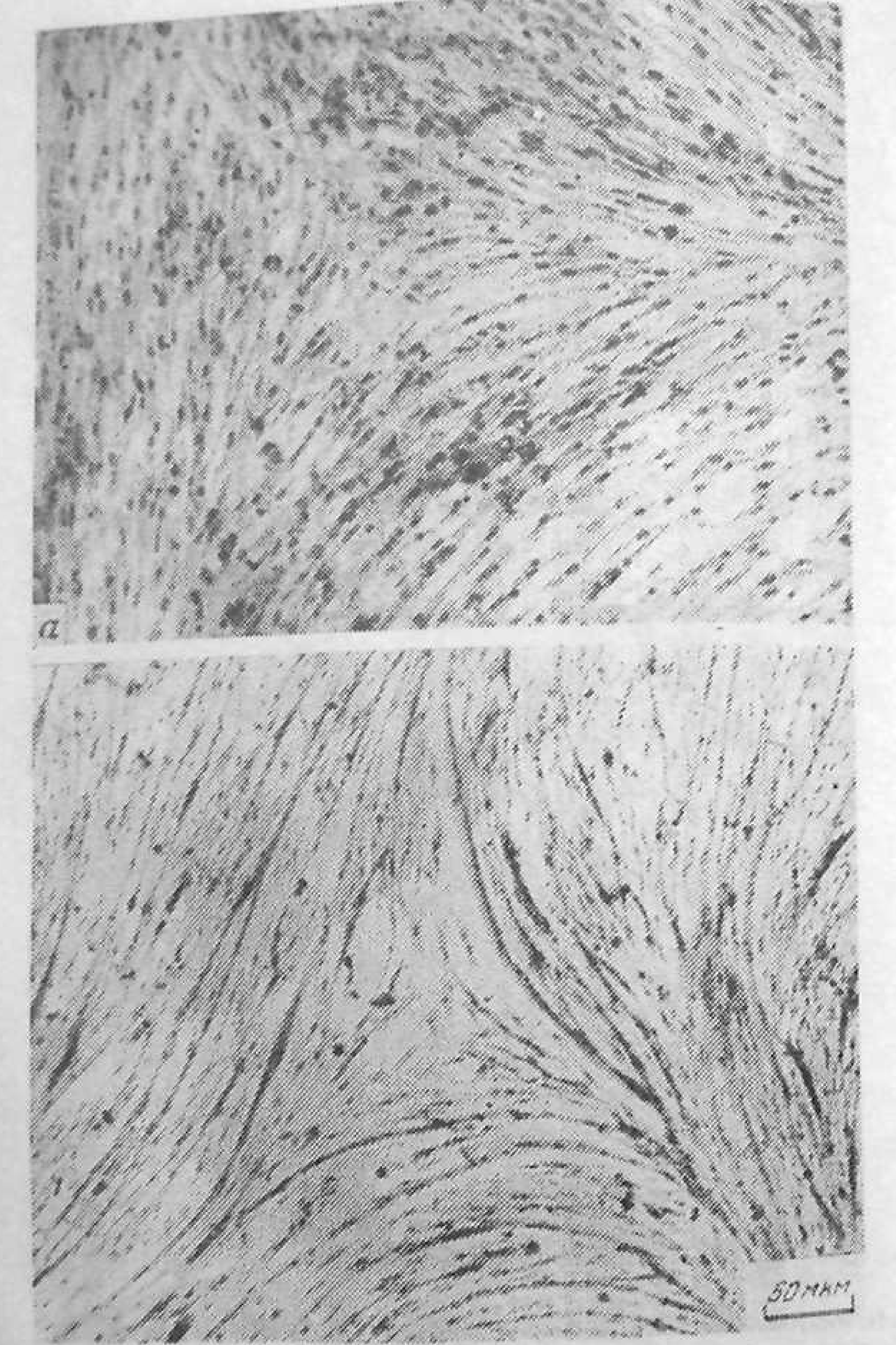


Рис. 87. Самоорганизация клеток в однослойной миогенной культуре

а — планарный паттерн потоков одноядерных миобластов; б — такой же топологический паттерн, образуемый миосимпластами и миотубами

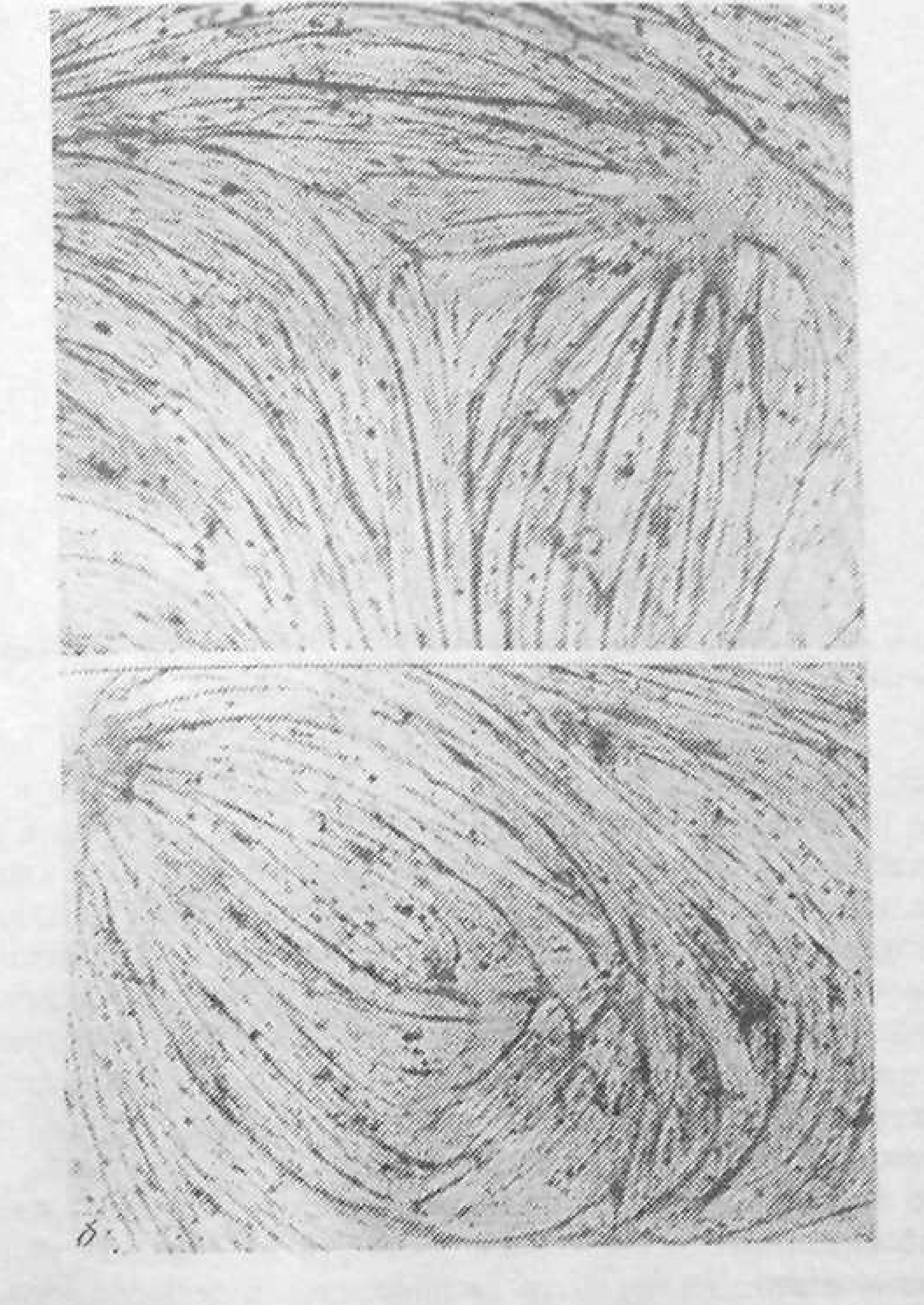


Рис. 88. Планарные паттерны пространственной организации миосимпластов и миотуб с топологическими сингулярностями

ядерных миобластов сменяется соответствующим пространственным расположением миотуб (рис. 87, б).

Преемственность паттернов пространственной организации одноядерных миобластов и многоядерных миосимпластов наблюдается и при постоянном культивировании миогенных клеток в среде с эмбриональным экстрактом, лишь переход от одноядерных клеток к многоядерным симпластам и миотубам менее резок. Рассмотрение пространственной организации мышечных трубок и симпластов иной морфологии в однослойной культуре позволяет выявить четкие паттерны топологических сингулярностей (рис. 88) (см.: Исаева, Преснов, 1990).

Как и в любой другой однослойной клеточной культуре, прикрепление и распластывание миогенных клеток по поверхности искусствен-

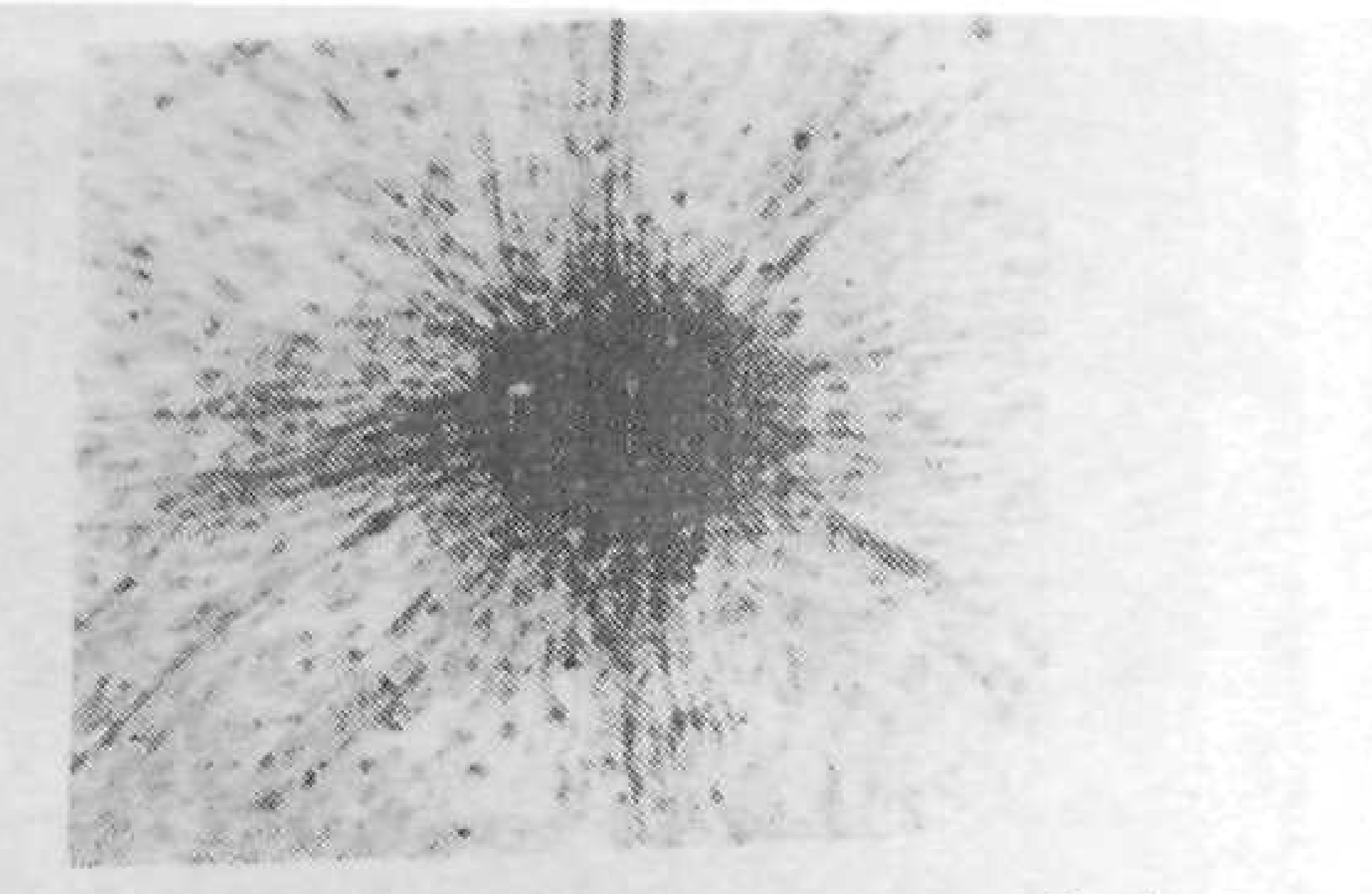


Рис. 89. Радиальный паттерн расположения миобластов и миотуб, обусловленный миграцией клеток из агрегата

ного твердого субстрата определяют плоскость, направляющую и ограничивающую процессы морфогенеза. *Двумерность морфогенеза в однослойной* миогенной культуре проявляется в расположении всех клеток и миосимпластов в единой плоскости. Отсутствие какой-либо анизотропии поверхности приводит к случайной пространственной организации биполярных миобластов и разнородной ориентации возникающих впоследствии миотуб. Повышенная однородная адгезивность искусственного двумерного субстрата вызывает появление ламеллярных мультиполярных *симпластов с аберрантным паттерном исчерченности*, т.е. отсутствием типичной монотонности ориентации полос.

Локальное параллельное расположение клеток ("потоки" клеток), подобное наблюдаемому в миогенной культуре на ровном субстрате, неоднократно описано для культур фибробластов и фибробластоподобных клеток (Elsdale, Foley, 1969; Elsdale, 1973; Elsdale, Wasoff, 1976; Самойлов и др., 1975; Yamada et al., 1976). Параллельная взаимная ориентация фибробластоподобных клеток – следствие контактной ориентации (см. ниже), тогда как пространственное взаиморасположение различных клеточных потоков зависит и от контактов клетка–клетка, и от контактов клетка–субстрат (Elsdale, Foley, 1969; Elsdale, 1973). Элсдейл впервые *применил топологический анализ к описанию планарных паттернов*, возникающих в конфлюэнтном слое фибробластов, и сравнил эти картины in vitro с паттернами дерматоглифики (Elsdale, 1973; Elsdale, Wasoff, 1976). Все найденные Элсдейлом в слое фибробластов типы топологических сингулярностей встречаются и в миогенной культуре (см.: Исаева, Преснов, 1990а). Однослойная миогенная культура более удобна для исследования планарных паттернов самоорганизации клеточного слоя, так как пространственная структура потоков одноядерных клеток закрепляется и становится более четкой в процессе слияния миобластов с образованием миотуб.

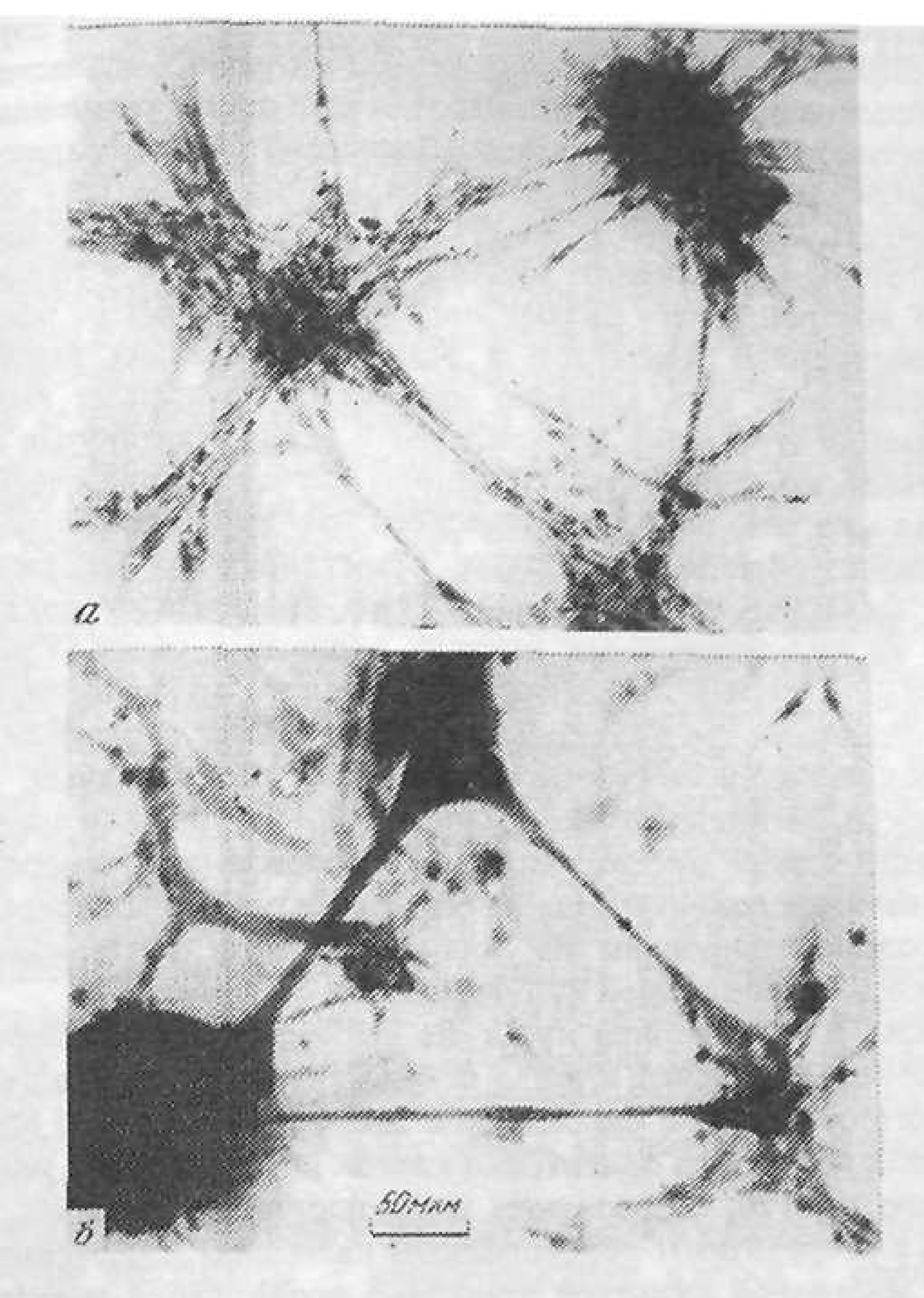


Рис. 90. *Образование клеточных мостиков между агрегатами миобластов (а) и дифференциация миотуб по линиям натяжения между агрегатами*

Если к исходной суспензии диссоциированных миогенных клеток куриного эмбриона добавить сыворотку, происходит быстрая агрегация клеток. После прикрепления агрегатов в однослойной фазе возникают необычные пространственные паттерны миогенеза. Радиальная направленность миграции клеток из каждого агрегата приводит к появлению радиального же (рис. 89) или звездчатого (рис. 90, *а*) паттерна расположения одноядерных миобластов и затем миосимпластов и миотуб. Соседние агрегаты соединяются тяжами миобластов, контактирующих друг с другом своими концевыми отростками (рис. 90, *а*). В ходе последующего миогенеза миобласты, образовавшие мостики между агрегатами, сливаются с преобразованием в миотубы (рис. 90, *б*). В итоге миотубы развиваются почти исключительно по линиям, соединяющим агрегаты, в то время как степень дифференцированности в других участках такой культуры мала.

Контактное ингибирование движения клеток (см.: Lackie, 1986) служит механизмом, определяющим радиальный паттерн миграции миобластов из агрегатов, а образование миобластами цепочек приводит к установлению клеточных мостиков между агрегатами. Последовательное соединение тяжами или цепочками замечено у клеток различных типов (Levy et al., 1976; Meller, Tetzlaff, 1976; Eckert et al., 1977), в том числе и у миобластов ("узнавание" готовыми к слиянию миобластами друг друга – Nameroff, Munar, 1976). У выстроившихся цепями миобластов наблюдается появление *специализированных контактов и взаимопроникающих выростов* соседних миобластов in vitro. Слияние миобластов превращает клеточные мостики между агрегатами в миопласты и затем в натянутые миотубы с поперечной исчерченностью. В данном случае вполне очевидна стимулирующая миогенез роль механического натяжения соединяющих агрегаты миосимпластических мостиков. Стимулирующая миофибриллогенез роль механического натяжения уже убедительно доказана Ванденбургом на культивируемых клетках скелетных мышц (Vandenburgh, 1982, 1983). В случае же растяжения плоского мультиполярного миосимпласта одновременно в нескольких направлениях, определяемых точками его закрепления на субстрате, возникает неоднородный паттерн исчерченности. Ветвление пучков миофибрилл и различная ориентация их в пределах одного миосимпласта, что обусловлено, по-видимому, механическим натяжением симпласта в нескольких различных направлениях, ясно продемонстрированы на препаратах цитоскелета миосимпластов в однослойной миогенной культуре (Isobe, Shimada, 1983).

Таким образом, в однослойной культуре наблюдаются существенные модуляции фенотипа мышечных клеток. Вследствие однородной адгезивности двумерного субстрата в однослойной миогенной культуре проявляются плоскостная контактная ориентация клеток и симпластов и тенденция к ветвлению миотуб, образованию мультиполярных ламеллярных миосимпластов с аберрантным неоднородным паттерном исчерченности. В однослойной миогенной культуре отчетливо проявляются планарные паттерны структурирования клеточного слоя с возникновением *топологических особенностей (точечных и линейных сингулярностей)*. Пространственная организация слоя миобластов и развивающихся из них миотуб преемственна: структура "потоков" одноядерных клеток закрепляется и становится более четкой в результате слияния миобластов и образования миотуб.

Наблюдаемые in vitro отклонения от типичного для организма пространственного паттерна миогенеза определяются контактными реакциями клетка–субстрат и клетка–клетка. Отсутствие клеточного и внеклеточного *окружения, несущего in vivo позиционную информацию*, которая организует миогенез в трехмерном пространстве почки конечности и всего организма зародыша, вызывает анархизацию расположения миобластов и миотуб. В то же время контактные взаимодействия подвижных миобластов ведут к самоорганизации клеточного слоя с возникновением упорядоченных структур, отсутствующих в организме.

ЛИНЕЙНАЯ КОНТАКТНАЯ ОРИЕНТАЦИЯ МИОБЛАСТОВ И МИОСИМПЛАСТОВ

В клеточной культуре источником позиционной информации о пространственном расположении миобластов и миотуб может быть анизотропный упорядоченный рельеф поверхности субстрата-подложки. Изучено морфогенетическое влияние физических ориентиров поверхности, служащей субстратом для прикрепления и передвижения клеток in vitro, на организацию миогенеза в пространстве (Исаева, 1980б). Исследованы также особенности митотического деления миобластов, допускающие преемственность упорядоченной *пространственной организации при* слиянии миобластов в миосимпласты (Исаева, 1981в).

На ровной поверхности всех использованных субстратов (нитроцеллюлоза, *плексиглас, стекло) миобласты* и развивающиеся из них миотубы располагаются описанным выше образом, ветвясь, пересекаясь и анастомозируя (см. рис. 85, 87, 88). На тех же субстратах с параллельной исчерченностью поверхности миобласты и миотубы располагаются вдоль бороздок субстрата, параллельно друг другу (рис. 91). На всех использованных субстратах с упорядоченным микрорельефом поверхности угол между двумя отдельными миотубами, как правило, не более 20° и никогда не превышает 30°, тогда как на субстратах с ровной поверхностью *величина угла между миотубами* варьирует от 0 до 90°.

Мышечные волокна на исчерченных субстратах отличаются значительно меньшей частотой ветвлений по сравнению с мышечными волокнами на ровной поверхности. Так, среднее число бифуркаций миотуб на плексигласе с ровной поверхностью составляет 13,7±3,8, на плексигласе с параллельными бороздками – 4,0±1,6, значимость различий очень высока ($t_d = 10,9$).

Контактная ориентация заметно выражена у одноядерных миобластов. *Типичные миобласты – веретеновидные клетки с овальным, иногда* значительно вытянутым по длинной оси клетки ядром. При контактной ориентации миобластов направление длинных осей клетки и ядра определяется внешними ориентирами. Контактная ориентация миобластов вдоль физических ориентиров субстрата в период пролиферации клеток перед слиянием их в миосимпласты предваряет и определяет упорядоченное расположение мышечных волокон. Возможна активная контактная реакция на рельеф субстрата не только миобластов, но и миосимпластов. В первые часы *после прикрепления на исчерченном субстрате* миосимпластов из суспензионной культуры (см. ниже) появляются симпластические "языки", выросты саркоплазмы с ядрами, направленные преимущественно вдоль бороздок поверхности.

Одноядерные клетки и многоядерные образования ориентируются также вдоль края субстрата-подложки, и эта ориентация сохраняется на некотором расстоянии от края. На узких полосках покровных стекол (шириной не более 400 мкм) миобласты и миотубы располагаются продольно *по длинной оси полоски (рис. 92). Подобная упорядоченная* организация одно- и многоядерных элементов наблюдается и в промежутках

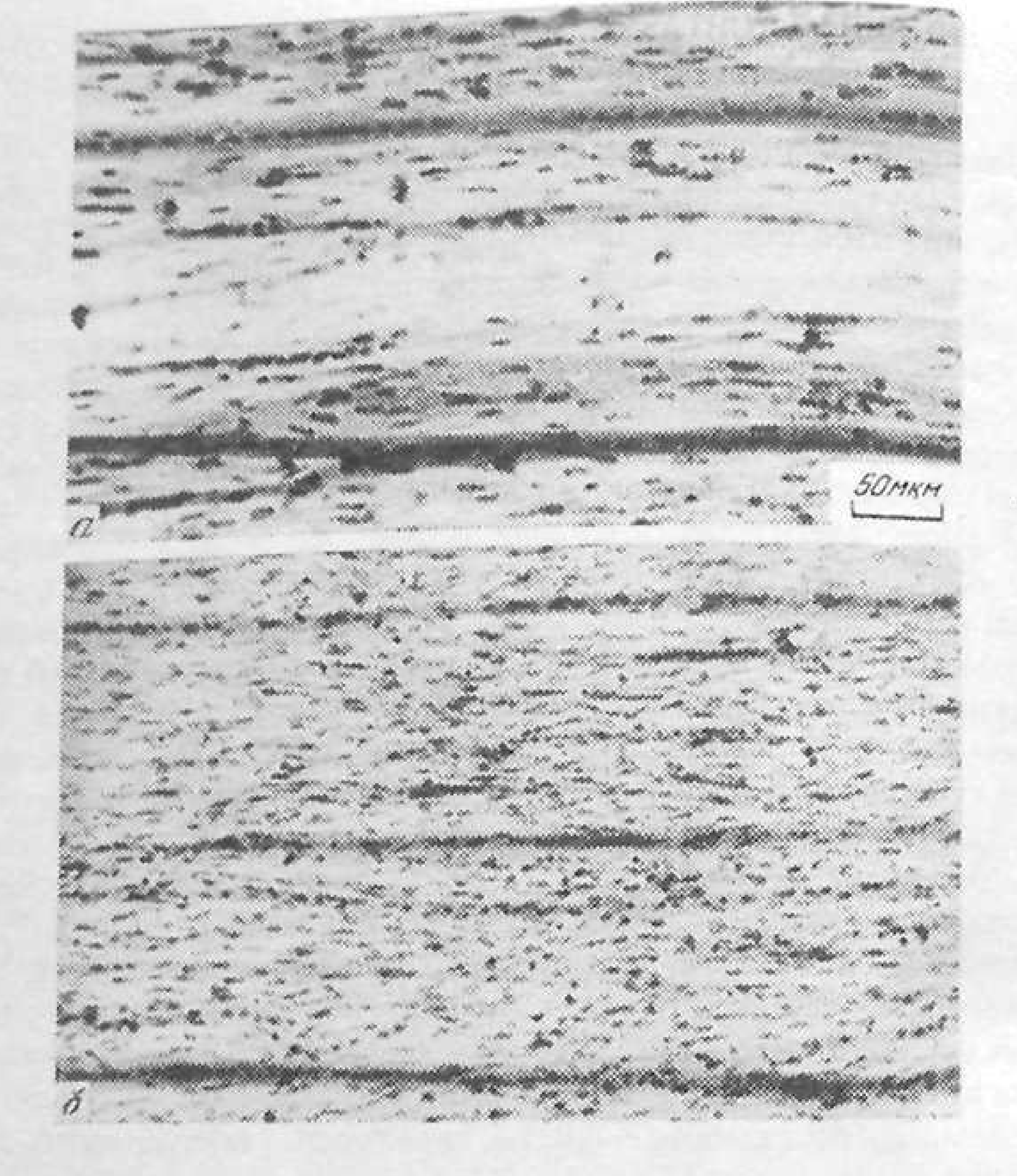


Рис. 91. Линейная контактная ориентация миобластов и миотуб на субстратах с упорядоченным рельефом

а – бороздками звукозаписи; б – неглубокими и частыми параллельными бороздками

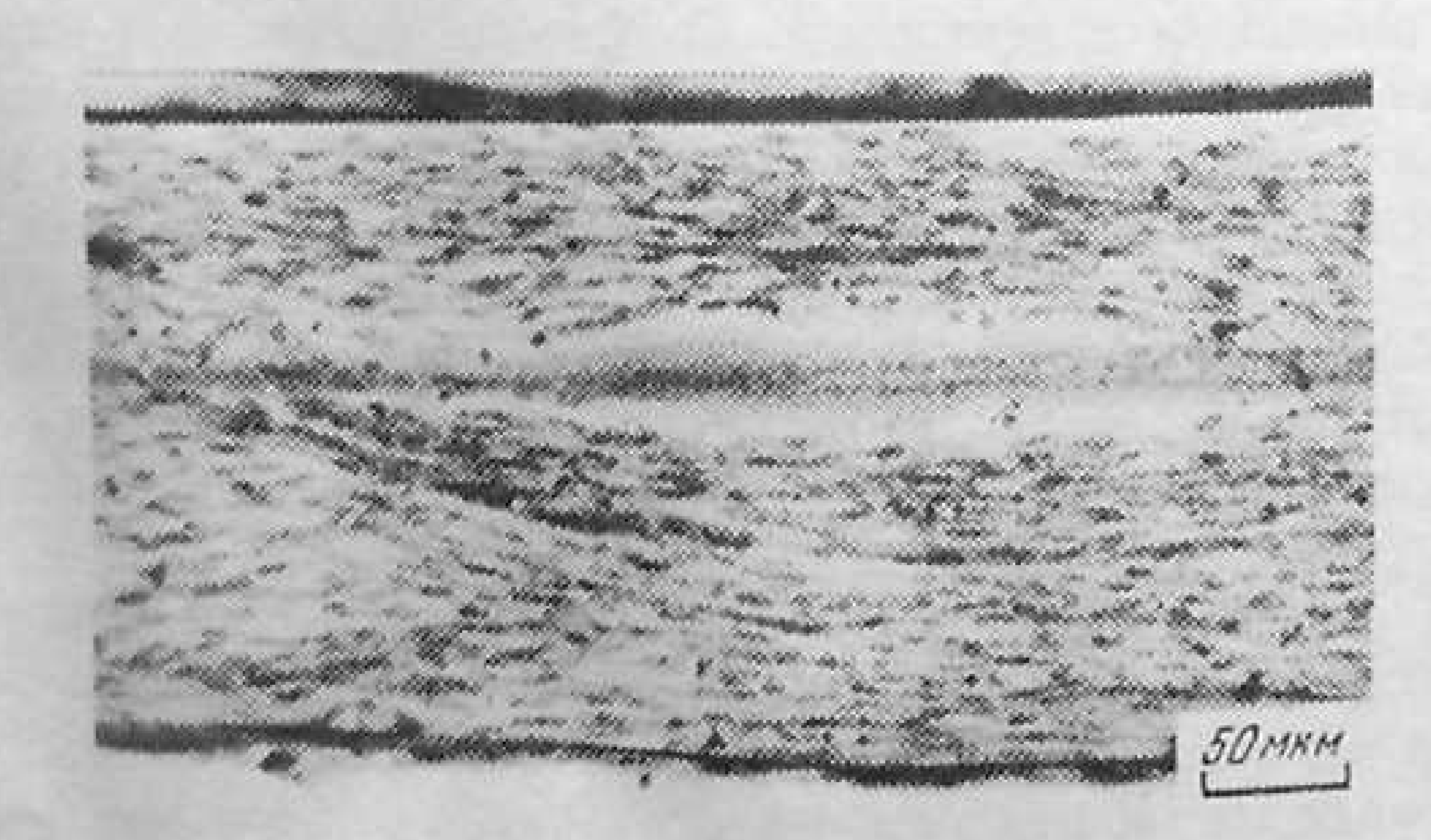


Рис. 92. Ориентация миобластов и миотуб, задаваемая физическими граничными условиями – краями полоски стекла

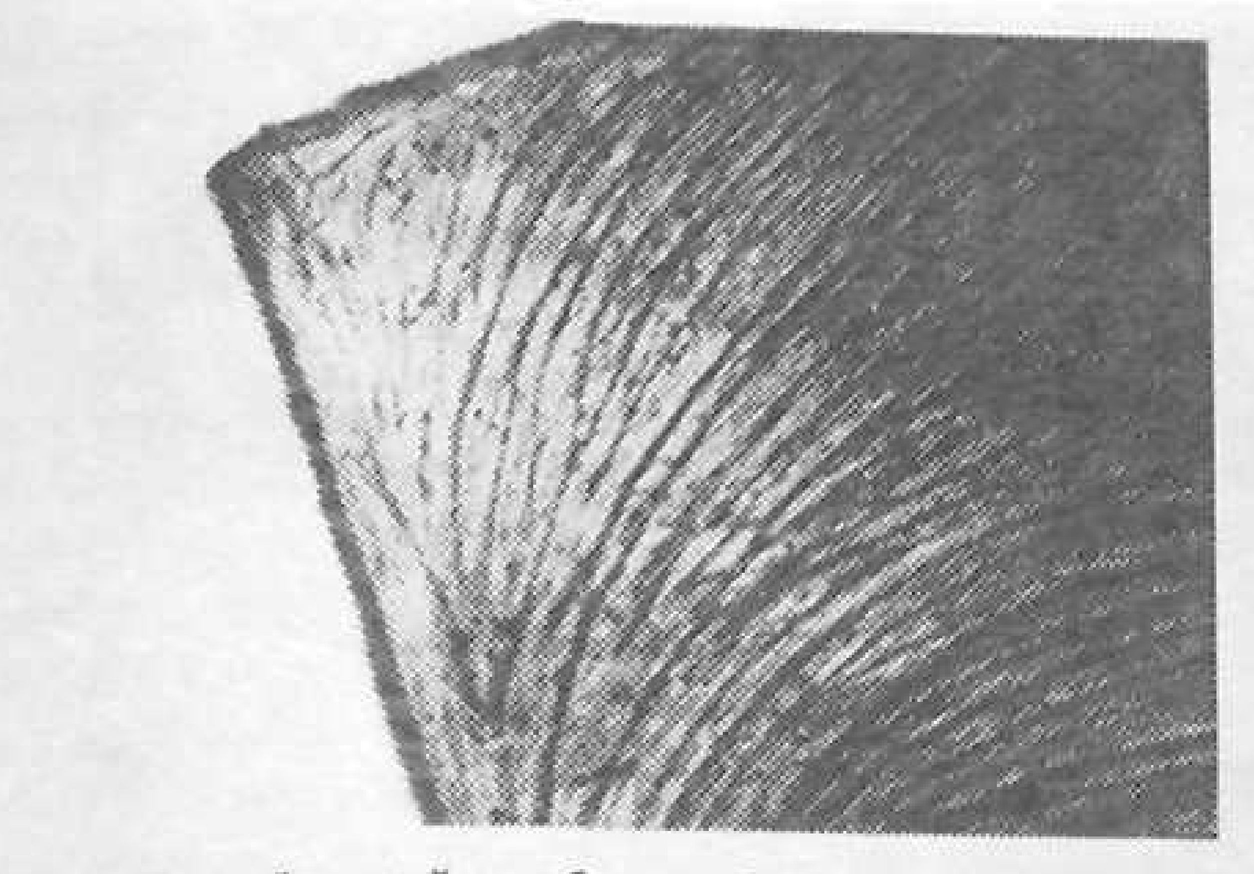
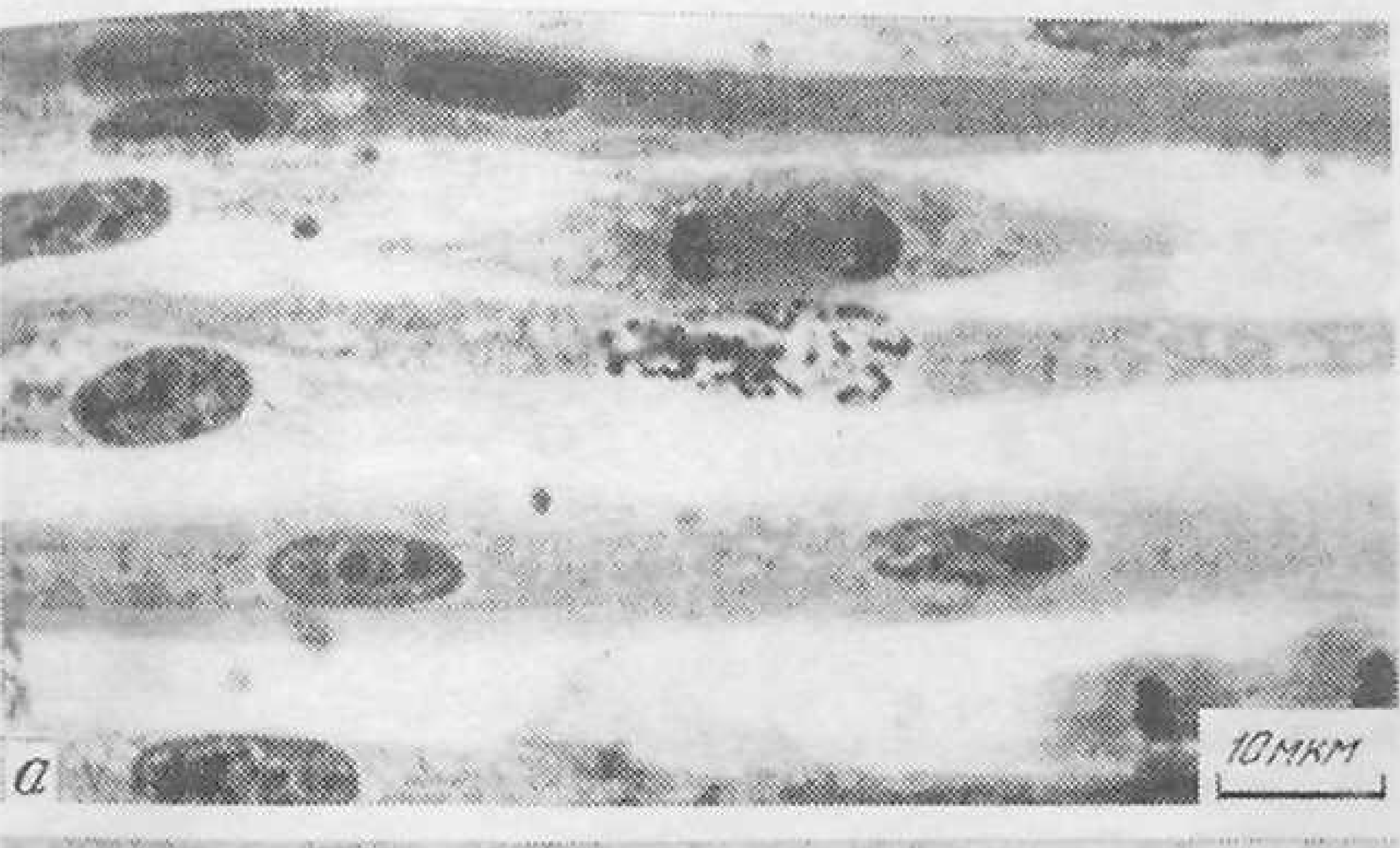


Рис. 93. Дугообразный изгиб миотуб в углу покровного стекла



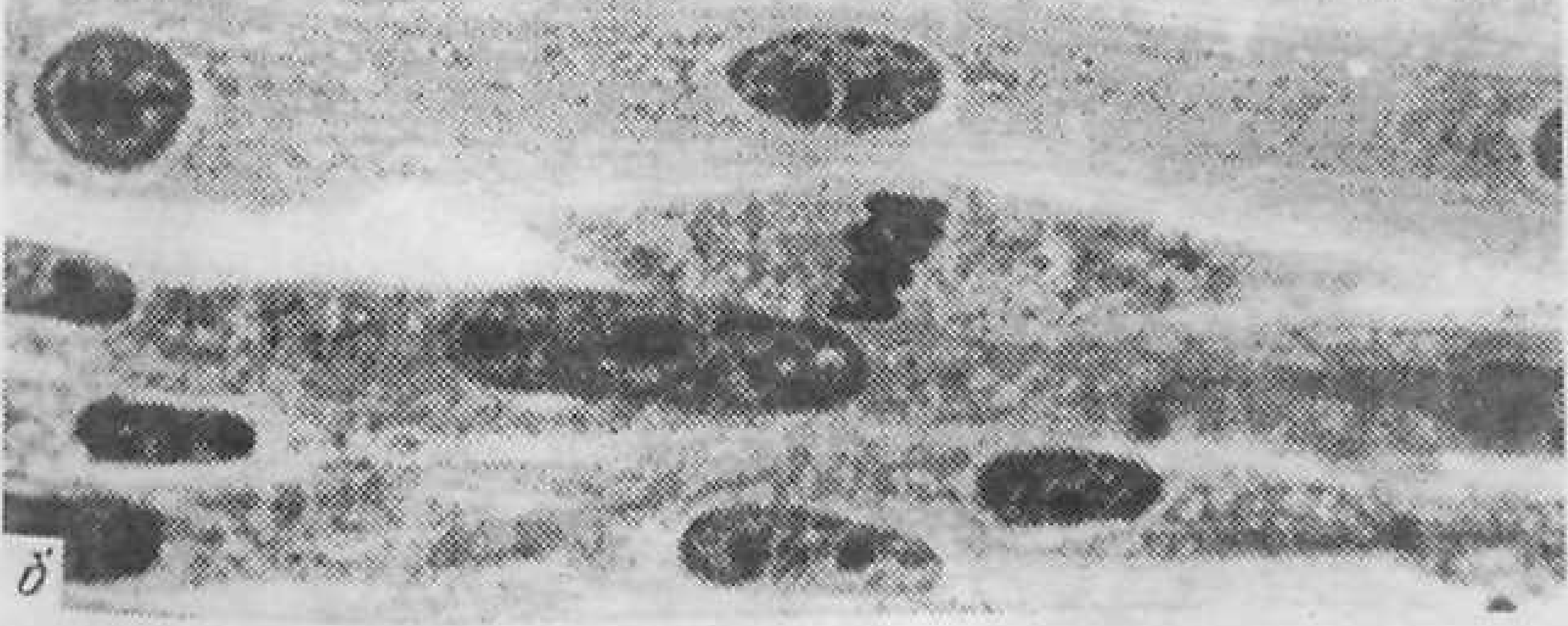


Рис. 94. Сохранение биполярной формы и контактной ориентации митотически делящимися миобластами

Сверху вниз – анафаза, профаза, метофаза

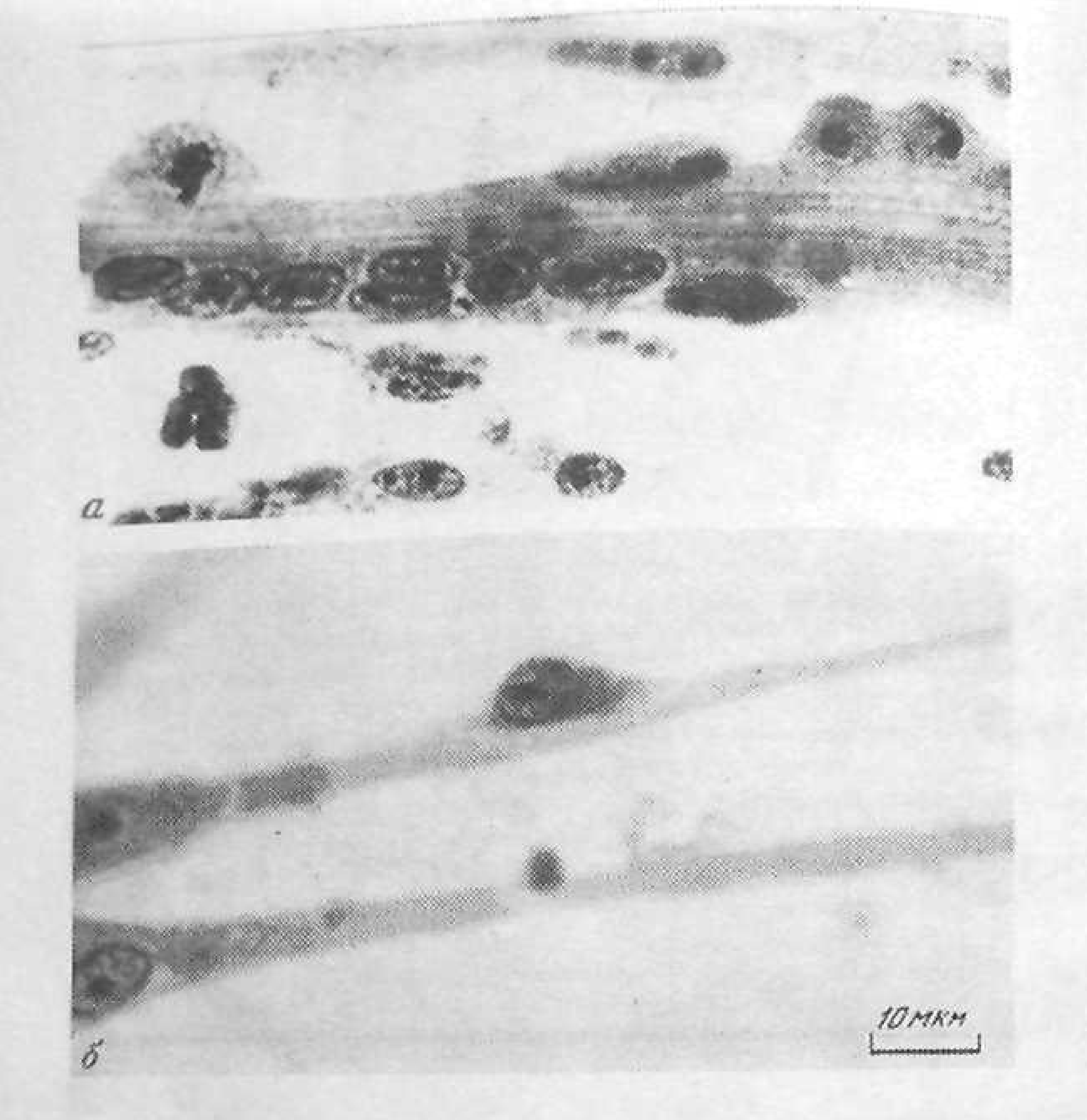


Рис. 95. Контактная ориентация миобластов вдоль миотуб
а – миобласты в метафазе и телофазе митоза; *б* – интерфазный миобласт

между бороздками. Максимальная величина расстояния, на котором поддерживается организующее влияние ориентира (края покровного стекла и бороздки на субстрате-подложке), около 200 мкм. Механизмом передачи контактной ориентации, заданной физическим ориентиром субстрата, служит параллельное взаимное расположение клеток. Таким образом, кроме непосредственной контактной реакции миобластов на форму субстрата наблюдается также взаимная ориентация этих биполярных клеток бок о бок, расположение их параллельными рядами.

Миотубы, развивающиеся внутри прямого угла, образованного краями покровного стекла, дугообразно изогнуты (рис. 93).

Митотически делящиеся миобласты не теряют своей биполярной формы и контактно-обусловленной ориентации (Исаева, 1981в). Поддержание типичной для миобластов биполярной веретеновидной формы с длинными концевыми отростками наблюдалось во всех формах митоза (рис. 94, *а*, *б*). Ориентация митотического веретена совпадает с направлением длинной оси клетки, плоскость метафазной пластинки хромосом

перпендикулярна этой оси (рис. 94, *б*). Миобласты в метафазе–телофазе становятся более утолщенными и компактными по сравнению с интерфазными и профазными клетками, концевые отростки их утончаются, но не втягиваются.

Веретеновидная поляризованная форма миобластов в митозе наблюдалась и на субстратах с ровной поверхностью (см. рис. 84), и на поверхности с параллельными бороздками (рис. 94). В последнем случае миобласты и возникающие путем их слияния миотубы ориентированы упорядоченно вдоль бороздок субстрата. Миобласты в митозе не теряют определяемой рельефом поверхности субстрата контактной ориентации, передавая ее дочерним клеткам; ориентация митотического веретена всех делящихся миобластов одинакова или близка, будучи параллельной бороздкам субстрата. Перед слиянием миобластов в миосимпласты одноядерные клетки выстраиваются друг за другом цепочками, тяжами; делящиеся в составе таких цепей миобласты сохраняют биполярную форму и видимые связи с соседними интерфазными клетками, и дочерние миобласты оказываются "встроенными" в общий клеточный тяж (см. рис. 84).

У миобластов, ориентированных вдоль поверхности миотуб, подобно сателлитным клеткам in vivo, митотическое веретено располагается по длинной оси клетки, параллельно поверхности миотубы (рис. 95, *а*). Наблюдается и параллельная ориентация интерфазных миобластов относительно миосимпластических образований; при этом миобласт плотно прилегает к поверхности миосимпласта, вытягиваясь вдоль нее (рис. 95, *б*).

Кроме сохранивших биполярную форму делящихся миобластов, в культуре миогенных клеток встречаются и типичные для большинства культивируемых клеток сферические метафазные клетки. Доля сферических и веретеновидных метафаз различна на 2-е и 5-е сутки культивирования. На 2-е сутки после эксплантации, в период интенсивной репродукции миобластов до начала слияния их в миосимпласты, доля сферических метафаз высока и составляет 68±7,5%. На 5-е сутки культивирования появляются способные к спонтанным сокращениям дифференцированные мышечные волокна; доля сферических метафаз падает до 19,7±8,3% от общего числа метафазных клеток, т.е. подавляющее большинство одноядерных репродуцирующихся клеток сохраняет в метафазе митоза типичную для миобластов биполярную веретенообразную форму. Митотически делящиеся биполярные миобласты, по-видимому, не теряют своих контактов с соседними клетками: прослеживаются связи тонких концевых отростков делящихся миобластов с отростками интерфазных миобластов.

Кроме биполярных и сферических метафазных клеток, встречались в небольшом количестве (6,8±4,2% всех метафаз) своеобразные промежуточные униполярные формы с односторонне расположенным отростком при неполном округлении клетки. Метафазные клетки мультиполярной, фибробластоподной формы наблюдались очень редко – около 0,1% всех метафаз.

Итак, упорядоченный микрорельеф поверхности субстрата оказывает четко выраженное организующее влияние на ориентацию и морфологию дифференцирующихся на нем миосимпластов: на исчерченных субстратах цепочки миобластов выстраиваются вдоль бороздок, что приводит к такой же конечной ориентации миотуб. Контактная ориентация фибробластов или фибробластоподобных клеток наблюдалась вдоль тяжей фибрина (Weiss, Garber, 1952), упорядоченно расположенных фибрилл коллагена (Elsdale, Bard, 1972; Overtone, 1977), стеклянных нитей (Curtis, Varde, 1964; Maroudas, 1973; Dunn, Heath, 1976), полимерных волокон (Славная и др., 1974), по бороздкам на субстратах с параллельной исчерченностью естественного (Васильев и др., 1971; Weiss, Taylor, 1956) или искусственного (Ровенский и др., 1971; Самойлов и др., 1975; Weiss, 1958; Eckert et al., 1977; McCartney, Buck, 1981; Brunette, 1986a; Clark et al., 1987, 1990, 1991; Curtis, Clark, 1990; Britland et al., 1992) происхождения. Эпителиальные клетки в какой-то мере тоже проявляют контактную ориентацию на субстратах с искусственными бороздками поверхности (Brunette, 1986b; Clark et al., 1990); при определенных условиях наблюдалась ориентация отростков нейронов вдоль бороздок (Clark et al., 1990). На анизотропных в отношении адгезивности клеток субстратах найдено сходное с контактной ориентацией расположение клеток по линиям или участкам лучшей адгезивности (Иванова и др., 1977; Carter, 1967; Letourneau, 1975; Cooper et al., 1976). Многократно продемонстрировано in vitro преимущественное прикрепление и перемещение клеток по участкам поверхности, покрытым теми или иными компонентами внеклеточного матрикса, служащего естественным субстратом для прикрепления клеток (см.: Исаева, Преснов, 1990a; Lackie, 1986). Описана ориентация миобластов и многоядерных миотуб по узким полоскам коллагенового субстрата (Ramirez, Aleman, 1972) либо вдоль фибрилл коллагена (Warren, 1981; Yoshizato et al., 1981), а также по определенным образом ориентированным отложениям фибронектина (Turner et al., 1983; Turner, Carbonetto, 1984; Turner, 1986).

Миогенная культура представляет собой удобную систему для изучения реакции клеток и надклеточных, миосимпластических образований на физическую структуру поверхности субстрата, а также исследования роли контактных явлений в дифференциации при переходе от клеточного к надклеточному уровню организации. На исчерченном субстрате ориентация миобластов соответствует его микрорельефу и однородна во всем клеточном слое. Контактная ориентация у миобластов сильнее выражена, чем у других типов клеток (Overtone, 1977), что связано, вероятно, с высокой степенью их поляризованности. Направление длинных осей клетки и ядра определяется при контактной ориентации миобластов внешними ориентирами подобно тому, что наблюдалось на фибробластоподобных клетках (Васильев и др., 1971, 1975; Самойлов и др., 1975). После слияния миобластов развиваются длинные, прямые, параллельно расположенные миотубы, резко падает степень их ветвления и анастомозирования; морфология и расположение миотуб имитируют при этом наблюдаемые in vivo черты организации мышечной ткани.

Расположение мышечных волокон на субстрате с упорядоченным рельефом поверхности зависит главным образом от предшествующей контактной ориентации миобластов; наблюдалась также непосредственная контактная реакция миосимпластов.

Контактная ориентация клеток, по всей вероятности, определяется и специфическими взаимодействиями рецепторов клеточной поверхности с лигандными молекулами внеклеточного матрикса, и чисто физическими граничными условиями. Роль физических границ и ориентиров наиболее наглядна при исследовании поведения клеток in vitro. Ориентация миобластов вдоль края стекла объяснима именно физическим ограничением возможности перемещения клеток (поскольку наиболее вероятно равномерное распределение адсорбированных на поверхности стекла лигандных молекул, источником которых в миогенной культуре служат сыворотка и эмбриональный экстракт). Линейная контактная ориентация клеток вдоль бороздок поверхности субстрата, по-видимому, тоже обусловлена прежде всего физическими ограничениями.

Биологический механизм контактной ориентации клеток вдоль края субстрата или бороздки на его поверхности может быть связан с линейностью структурных элементов цитоскелета (Dunn, Heath, 1976). Биполярная веретеновидная форма миобластов и трубковидная морфология типичных миосимпластов зависят от линейных цитоскелетных структур – пучков миофиламентов и продольно ориентированных микротрубочек (Warren, 1974; Sanger, Sanger, 1977). Дугообразная форма миотуб, "вписанных" в прямой угол края стекла, дает возможность оценить и степень ригидности, и меру гибкости структур цитоскелета, допускающих плавный изгиб, но не сгибание миотуб под углом. У клеток с иной морфофункциональной организацией цитоскелета может проявиться иная реакция на форму субстрата: так, у эпителиальных клеток обнаружено перегибание ламеллоподии в соответствии с геометрией субстрата (Brunette, 1986b).

Дополнительным механизмом, поддерживающим контактно-обусловленную ориентацию клеток, служит взаимное параллельное расположение миобластов. Множественные параллельные ряды миобластов выстраиваются вдоль бороздок или краев субстрата-подложки. Предельное расстояние, на котором взаимная ориентация миобластов передает и поддерживает обусловленную топографией субстрата клеточную ориентацию, оказалось весьма значительным – 200 мкм.

Ориентация миобластов вдоль миосимпластов очень сходна с расположением сателлитных клеток (Muir, 1970; Ischikawa, 1970; Campion, 1984). Подобная ориентация, а также контактное направление миграции клеток вдоль поверхности других, представляющее, по-видимому, один из реальных механизмов направленного движения, неоднократно обнаружены in vivo и in vitro (см.: Исаева, Преснов, 1990a; Lacke, 1986). Параллельная ориентация клеток вдоль других клеток или симпластов внешне сходна с контактной реакцией на ориентиры неживого субстрата. Боковое прилежание клеток может быть в различной мере обусловлено как чисто контактной их ориентацией (зависящей от физической формы

клетки-субстрата), так и специфической адгезивностью клеточных поверхностей. Контактная ориентация в миогенной культуре на исчерченной поверхности становится более выраженной при образовании цепей миобластов и слиянии миобластов в многоядерные симпласты. Возникшие миосимпласты в свою очередь могут служить ориентирами, упорядочивающими расположение оставшихся миобластов.

Преемственность ориентации длинной оси премитотической клетки и направления веретена деления, найденная у фибробластоподобных клеток (Васильев и др., 1974; Иванова и др., 1974), наблюдалась и у миобластов. Миобласты в отличие от других типов культивируемых клеток не теряют и в митозе своей веретеновидной формы и контактно-обусловленной ориентации, передавая ее дочерним клеткам, что поддерживает упорядоченное клеточное расположение (Исаева, 1981 в).

Обычное для культивируемых клеток округление в метафазе митоза объясняется деполимеризацией кортикальных актиновых микрофиламентов и цитоплазматических микротрубочек и перераспределением актина и тубулина в связи с образованием митотического веретена и борозды деления (Weber et al., 1975; Fujiwara, Pollard, 1978; Aubin et al., 1979). В цитоплазме митотически делящихся и остающихся при этом уплощенными и мультиполярными клеток линии PtK_2 найдены небольшие интактные пучки актиновых микрофиламентов (Aubin et al., 1979). У сохраняющих вытянутую или мультиполярную форму при митозе in vitro миоцитов сердца лишь частично разрушается саркомерная зона (Good, 1975; Kelly, Chacko, 1976); частичное сохранение упорядоченной организации миофиламентов при митозе миоцитов сердца in vivo ранее было показано Румянцевым (1973). Гладкомышечные клетки in vivo также остаются удлиненными биполярными во всех фазах митоза (Gabella, 1979); при митозе миоцитов гладких мышц сократительный аппарат сохраняется в концевых частях миоцитов (Румянцев, 1977).

У одноядерных скелетно-мышечных миобластов саркомерная организация в норме отсутствует, хотя возможно ее возникновение при некоторых экспериментальных условиях (Holtzer et al., 1975; Trotter, Nameroff, 1976); актиновые филаменты ориентированы параллельно длинной оси миобласта и располагаются под плазматической мембраной (Moss et al., 1979). Возможно, филаменты цитоплазмы всех мышечных клеток относительно стабильны при митозе.

Значительное повышение (примерно до 80% на 5-е сутки культивирования) доли сохранивших веретеновидную форму метафазных миобластов, вероятно, связано с "созреванием" их (перед слиянием в миосимпласты) и приобретением большей стабильности цитоскелета. Известно, что в неклонированной культуре клеток бедренной мышцы куриного эмбриона около 20% всей популяции клеток составляют фибробласты (Hauschka, Konigsberg, 1966); фибробласты же куриного эмбриона типичным образом округляются в метафазе (Stenman et al., 1977). Возможно, на 5-е сутки культивирования только фибробласты принимают сферическую форму в митозе (наиболее выраженную в метафазе). Не исключена также существенная роль в поддержании удлиненной формы делящихся миобластов прочных и сохраняющихся в течение митоза контактов делящейся клетки с соседними интерфазными; именно на поздних сроках культивирования плотность клеток и вероятность контактов их высоки. Наличие своеобразных "униполярных" форм метафазных миобластов с одним длинным отростком, возможно, подтверждает значение клеточных связей в определении формы делящегося миобласта. Известно, что отростки миобластов связаны специализированными клеточными контактами и взаимопроникающими выростами поверхности соседних клеток (Shimada, 1971; Lipton, Konigsberg, 1972; Kalderon et al., 1977); делящиеся без округления миоциты сердца сохраняют свои контакты с соседними клетками (Румянцев, 1973).

Итак, контактная ориентация миобластов и миосимпластов вдоль ориентиров живого или неживого субстрата для их прикрепления (соседних миобластов и миотуб или бороздок искусственного субстрата) проявляется весьма четко и совершенно. Митотически делящиеся миобласты способны поддерживать свою биполярную форму и параллельную бороздкам субстрата ориентацию, сохраняющуюся и у дочерних клеток. Ориентация митотического веретена почти всех делящихся миобластов на исчерченном субстрате одинакова. На субстрате с ровной поверхностью направление длинной оси митотического веретена и всей сохранившей биполярную форму и контакты с соседними миобластами клетки совпадает с ориентацией общего тяжа миобластов, в который оказываются встроенными и дочерние клетки. Подобная одинаковая ориентация митотических осей миоцитов была найдена в гладкой мышце in vivo (Gabella, 1979). Направляемая ориентирами живого или неживого субстрата ориентация делящихся миобластов скелетной мышцы или моделирующей ее организацию системы in vitro может рассматриваться как механизм поддержания упорядоченности клеточной системы и направленного роста мышечных клеток.

Направляемая упорядоченной структурой поверхности субстрата параллельная ориентация прямых длинных мышечных волокон в однослойной культуре лишь частично имитирует организацию нормальной мышцы (отсутствие трехмерности и организованных соединительно-тканных элементов), демонстрируя при этом достаточность физической структуры поверхности субстрата как фактора, организующего пространственно упорядоченный миогенез в однослойной клеточной культуре. Беспорядочная ориентация мышечных волокон in vivo наблюдается при нарушении нормальной тканевой организации – в саркомах (Nameroff, 1970) и на начальных этапах регенерации измельченной реимплантированной мышцы (Carlson, 1970). Ориентация и морфология миотуб в этих случаях сходны с наблюдаемыми при миогенезе in vitro на субстратах с ровной поверхностью. Нормальная параллельная ориентация линейных мышечных волокон в организме определяется совокупностью различных факторов, включающих и ориентированное расположение фибрилл внеклеточного матрикса, и определенную направленность механического стресса, и другие влияния (см.: Карлсон, 1986).

МОДУЛЯЦИИ ФЕНОТИПА МИОГЕННЫХ КЛЕТОК В СУСПЕНЗИОННОЙ КУЛЬТУРЕ

В то время как однослойная миогенная культура – одна из самых изученных и часто используемых дифференцирующихся in vitro клеточных систем, культивирование миогенных клеток в суспензии применялось относительно редко (Moscona, Moscona, 1952; Moscona, 1956; Kemp, 1970; Knudsen, Horwitz, 1977). В упомянутых работах исследовались агрегация миобластов и влияние на нее ряда факторов, описано строение агрегатов и начало слияния миобластов, однако наблюдалось появление лишь небольших миосимпластов с немногочисленными ядрами. Культивирование миогенных клеток куриного эмбриона в суспензии было применено с целью исследования зависимости миогенеза от прикрепления к твердому субстрату (Исаева, 1979; Керкис, Исаева, 1981б, 1983; Исаева, Керкис, 1988).

В суспензионной культуре миогенных клеток (Исаева, 1979) в первые же несколько часов культивирования возникают трехмерные клеточные агрегаты, размеры которых возрастают за счет присоединения одиночных клеток, митотического деления клеток в агрегатах, а также объединения мелких агрегатов в более крупные. Через сутки одиночных клеток в суспензии почти не остается. Через 4 сут максимальный диаметр округлых агрегатов достигает 1,5 мм, изредка возникают удлиненные конгломераты длиной до 5 мм и толщиной около 1 мм.

Значения митотического индекса в агрегатах из суспензии (1,6% через 24 ч и 0,5% через 4 сут) оказались близкими к показателям для однослойной культуры (1,8 и 0,9% соответственно). Через 12 ч после начала культивирования суспензии агрегаты состоят из морфологически однотипных, одноядерных клеток (рис. 96). Обычны митозы клеток, составляющих такие агрегаты. Индекс меченых ядер после 12-часовой инкубации с ^{3}H-тимидином достигал примерно 50% (рис. 97).

Первые миосимпласты появляются через 24 ч. Индекс слияния в суспензии несколько превышает этот показатель для контрольной однослойной культуры: через 24 ч в суспензии 9% ядер в симпластах, в слое на стекле – 1%, через 4 сут в суспензиях – 53%, на стекле – 49%.

Существенно различна морфология миосимпластических образований в суспензионной и однослойной культурах. Симпласты в однослойной культуре обычно принимают типичную для миотуб морфологию с линейным расположением овальных ядер, оттесняемых в зрелых миотубах поперечно-исчерченной миофибриллярной зоной на периферию.

В суспензионной культуре мелкие агрегаты (до 50 мкм в диаметре) через 4 сут превращаются в сплошные симпластические шары (рис. 98): подсчитанное на серийных срезах число ядер в таких сферах достигает нескольких десятков. Центральная часть более крупных (50–150 мкм в диаметре) сферических миосимпластов вакуолизируется. В агрегатах с диаметром более 150 мкм через 4 сут периферическая часть образована массивной миосимпластической "корой", часто неравномерной толщины и местами вакуолизированной, с беспорядочными скоплениями множест-

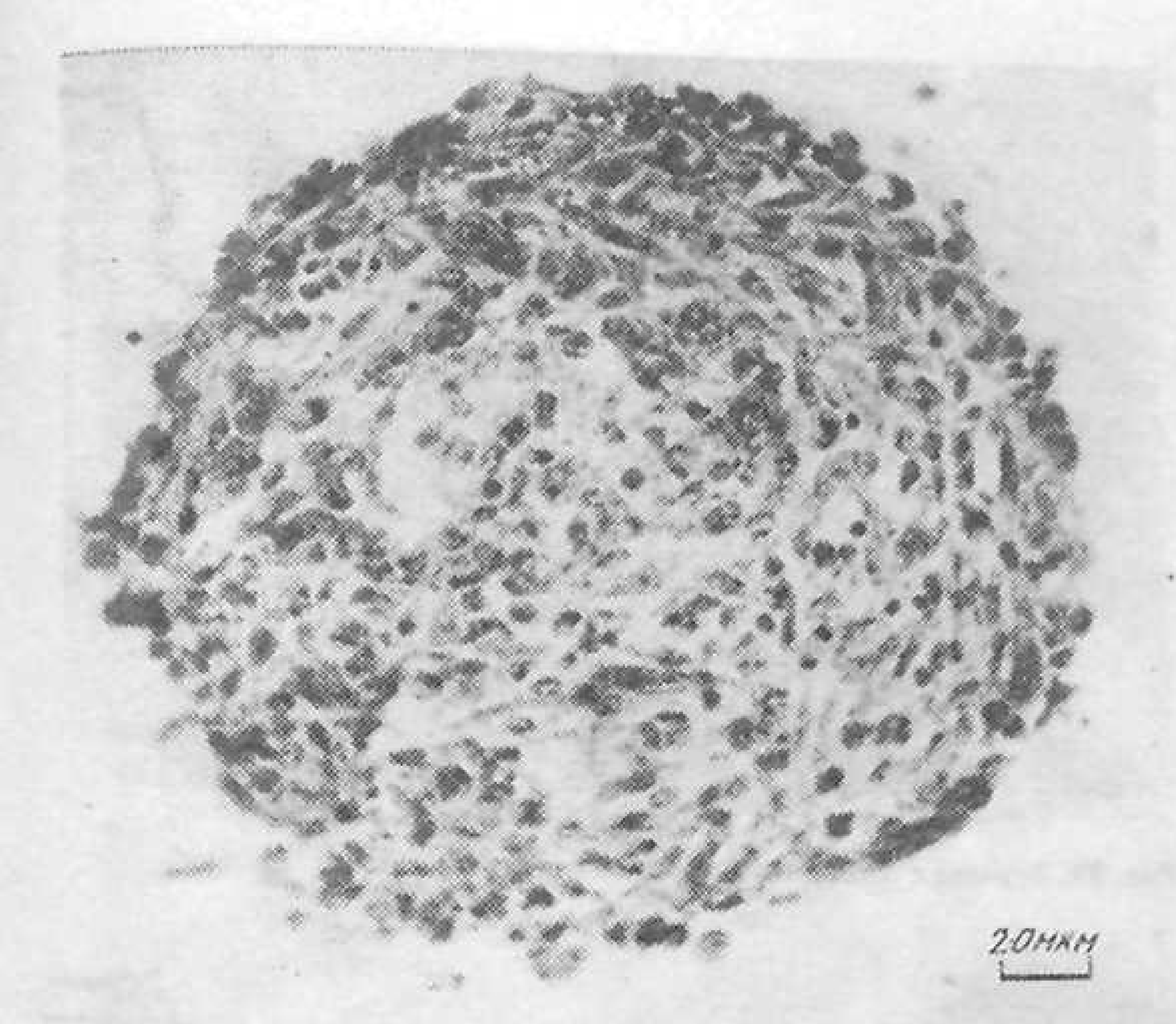


Рис. 96. Морфология агрегата миогенных клеток через 12 ч культивирования в суспензии (срез)

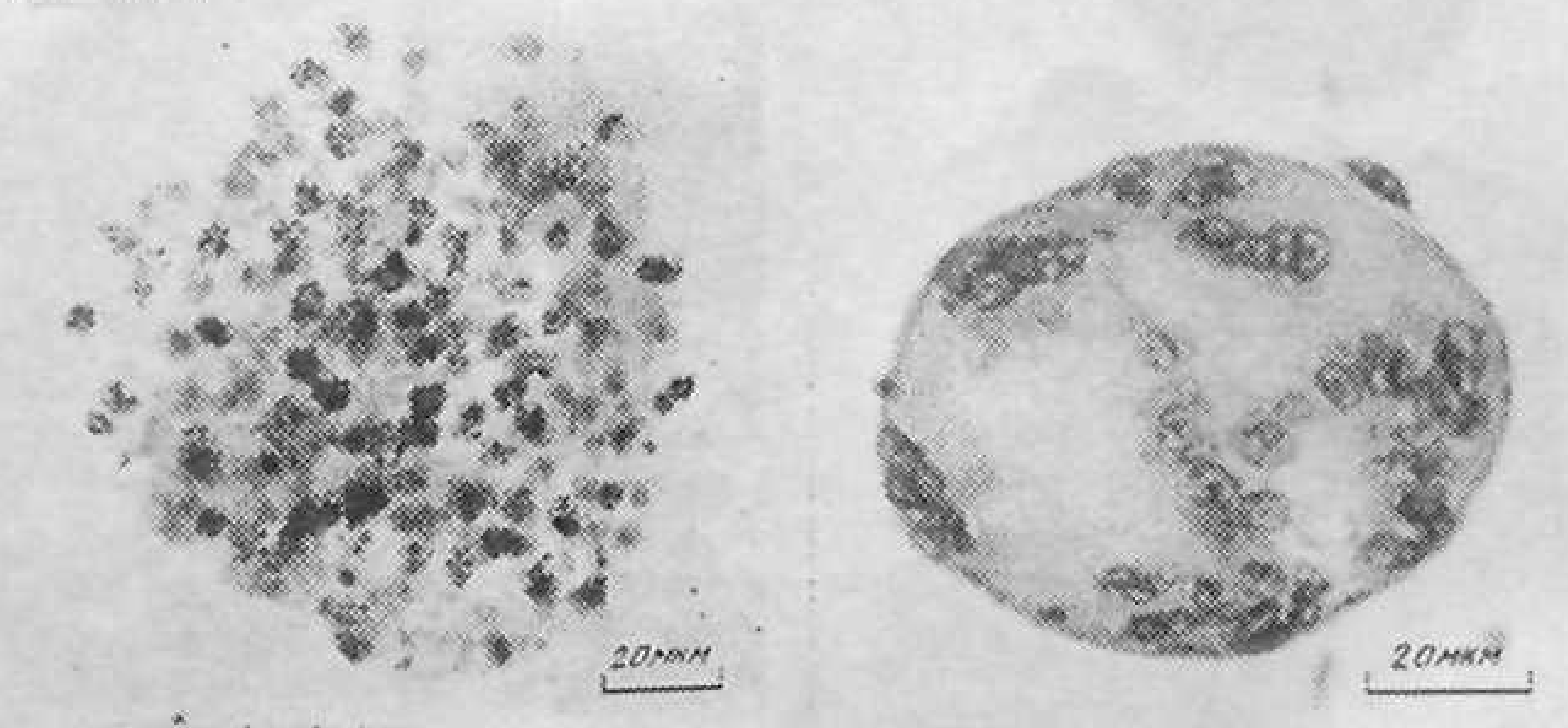


Рис. 97. Включение ^{3}H-тимидина в клетки агрегата суспензионной культуры через 12 ч

Рис. 98. Сферический миосимпласт (суспензионная культура, 4 сут)

ва ядер (рис. 99). Форма ядер в миосимпластах из суспензионной культуры округлая или слегка угловатая (при сдавливании ядра соседними). Число ядер в толстом поверхностном миосимпласте крупных агрегатов достигает нескольких сотен. Как правило, в миосимпластах из суспензии отсутствует поперечная исчерченность, обычная для мышечных волокон однослойной культуры. Лишь изредка в самых крупных (более 500 мкм в диаметре) агрегатах встречаются удлиненные миотубоподобные симпласты с поперечной исчерченностью и упорядоченным расположением ядер.

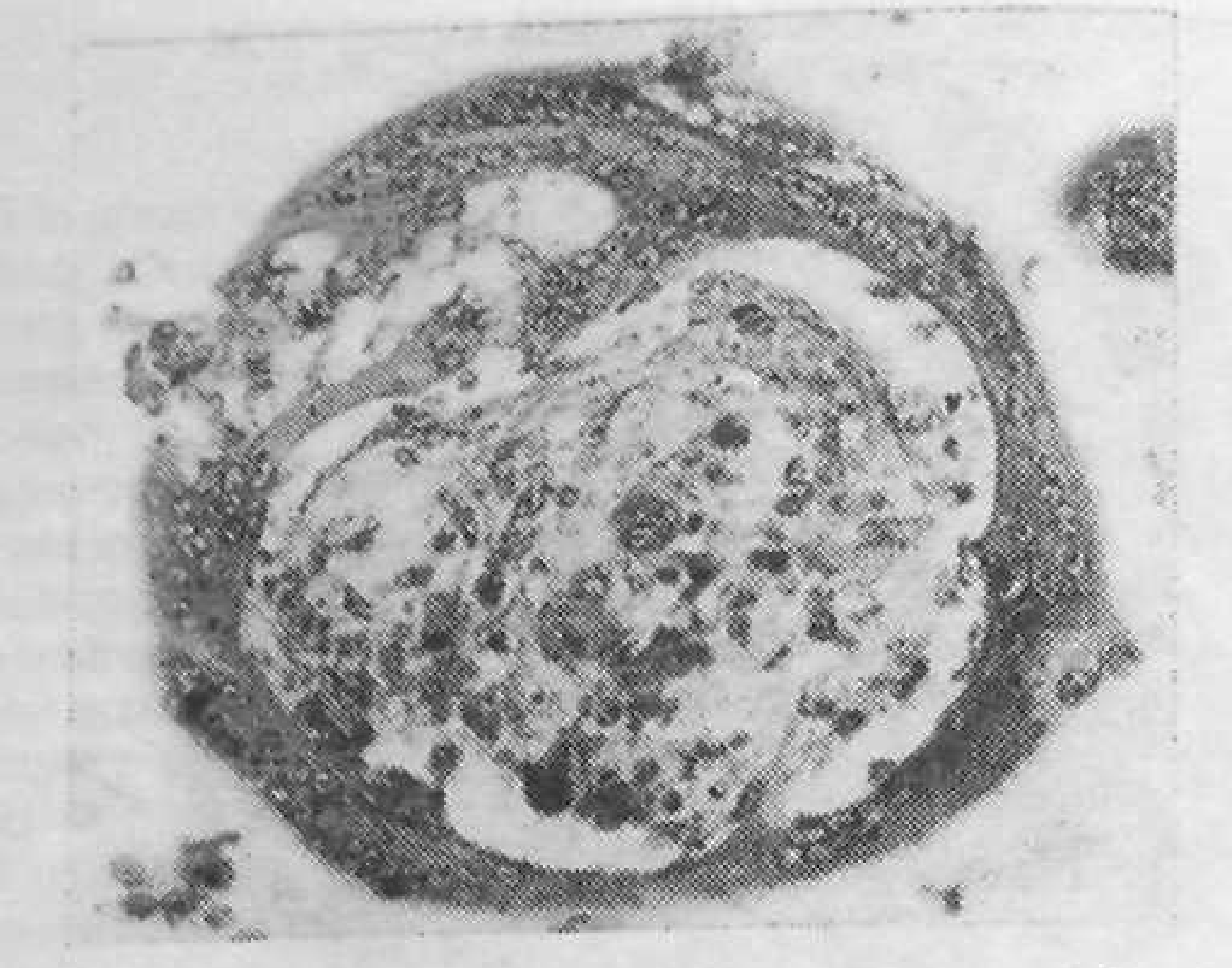


Рис. 99. Агрегат с миосипластическим наружным слоем (4 сут)

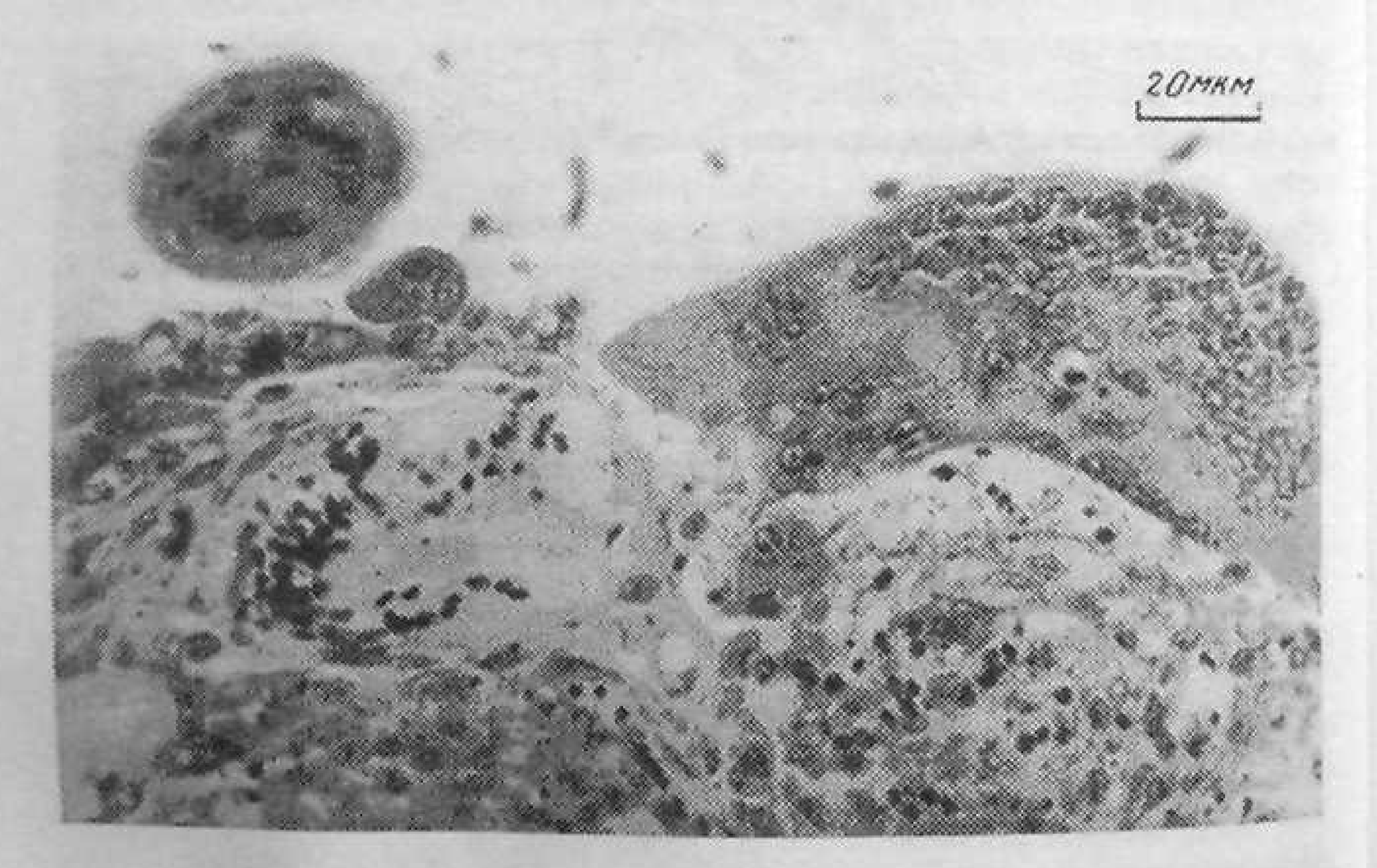


Рис. 100. Участок крупного агрегата с наружным миосимпластом, хондроцитоподобными и фибробластоподобными клетками внутри агрегата

В центральной части 4-суточных агрегатов диаметром 150–500 мкм под толстым симпластическим слоем рыхло расположены фибробластоподобные клетки. Внутренняя часть самых крупных агрегатов (более 500 мкм) занята клетками, морфологически сходными с фибробластами и хондроцитами, а также внеклеточным материалом (рис. 100).

Формирование сплошных сферических миосимпластов или миосимпластического наружного слоя крупных агрегатов – конечная фаза мио-

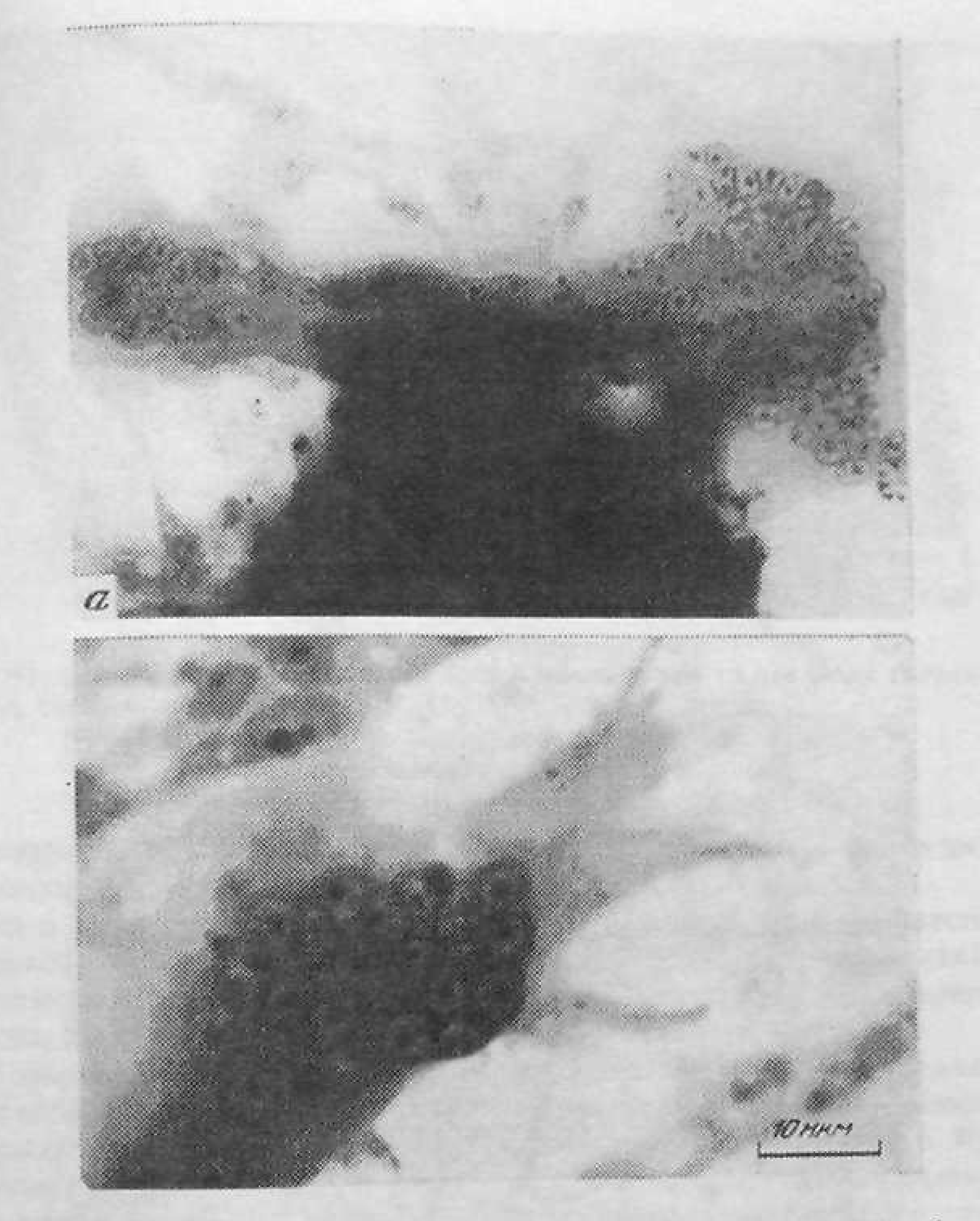


Рис. 101. Миосимпласты из суспензионной культуры после прикрепления к субстрату
а – миосимпластические ламеллы; *б* – цитоплазматические отростки движущегося миосимпласта

генеза в условиях суспензионной культуры. Через 6 сут культивировании миосимпласты не становятся более дифференцированными, появляются признаки дегенерации агрегатов (пикнотические ядра, разрушающие клетки). В однослойной культуре на 5–6-е сутки начинаются спонтанные сокращения дифференцированных мышечных волокон, слой открепляется от стекла и дегенерирует.

После перенесения агрегатов из 4-суточной суспензии в однослойную культуру они в течение 12–24 ч прикрепляются к стеклу и уплощаются, происходит выселение на стекло одноядерных клеток и "растекание", продвижение миосимпластов языковидными выступами (рис. 101, *а*). Движущийся передний край миосимпластов, свободный от ядер, спосо-

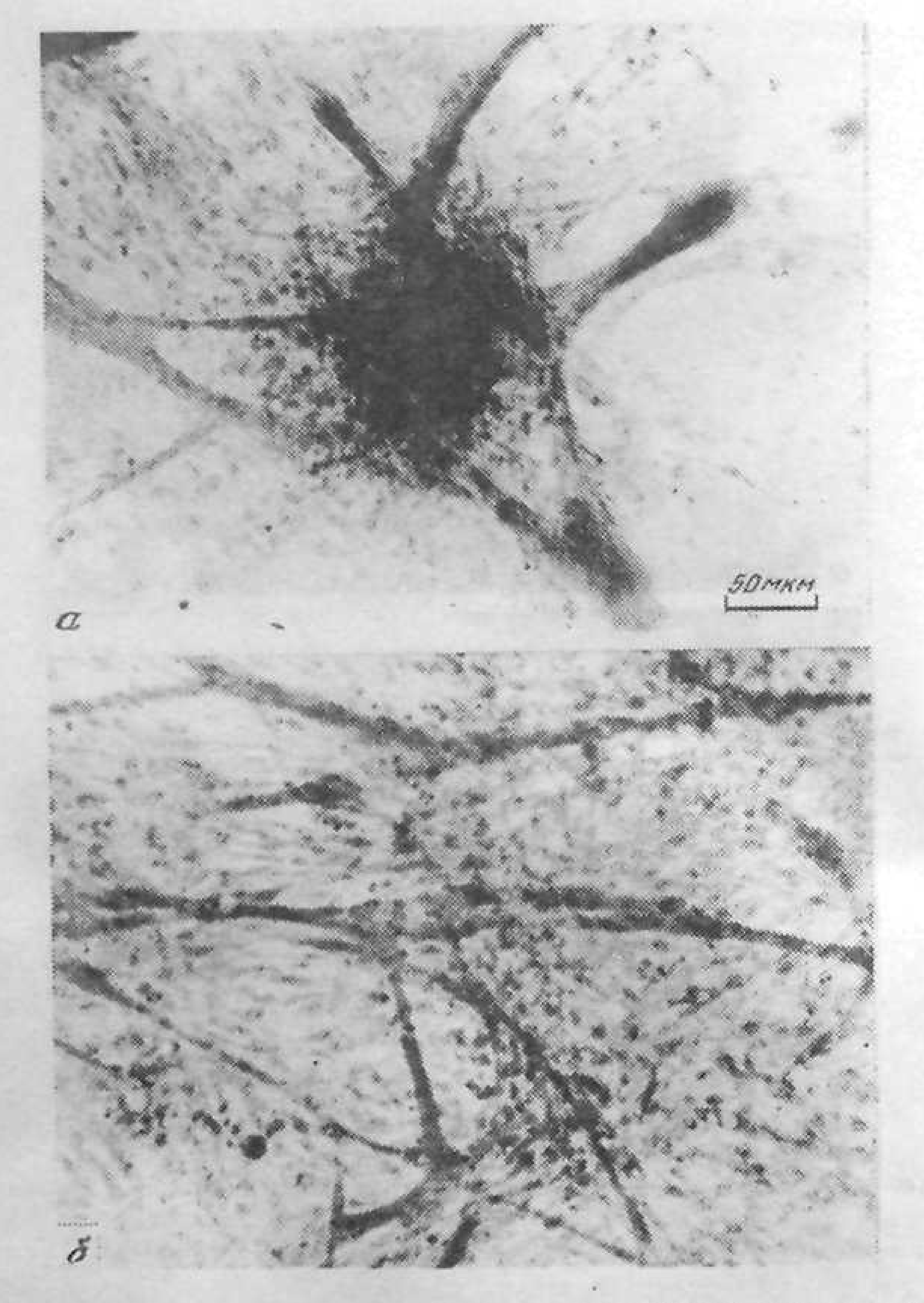


Рис. 102. Удлинение миосимпластов и образование миотуб после перевода из суспензионной культуры в однослойную

а — через 24 ч; б — через 3 сут

бен к образованию псевдодиальных выростов (рис. 101, б), характерных для движения немышечных клеток. В течение 2–3 сут после перенесения агрегатов из суспензии на твердый субстрат морфология миосимпластов изменяется, симпластические массы на стекле постепенно удлиняются, превращаясь в обычные для однослойный культуры миотубы (рис. 102, а). Через 3 сут однослойная культура, полученная из суспензионных агрегатов, отличается от контрольной лишь сохранившимися кое-где остатка-

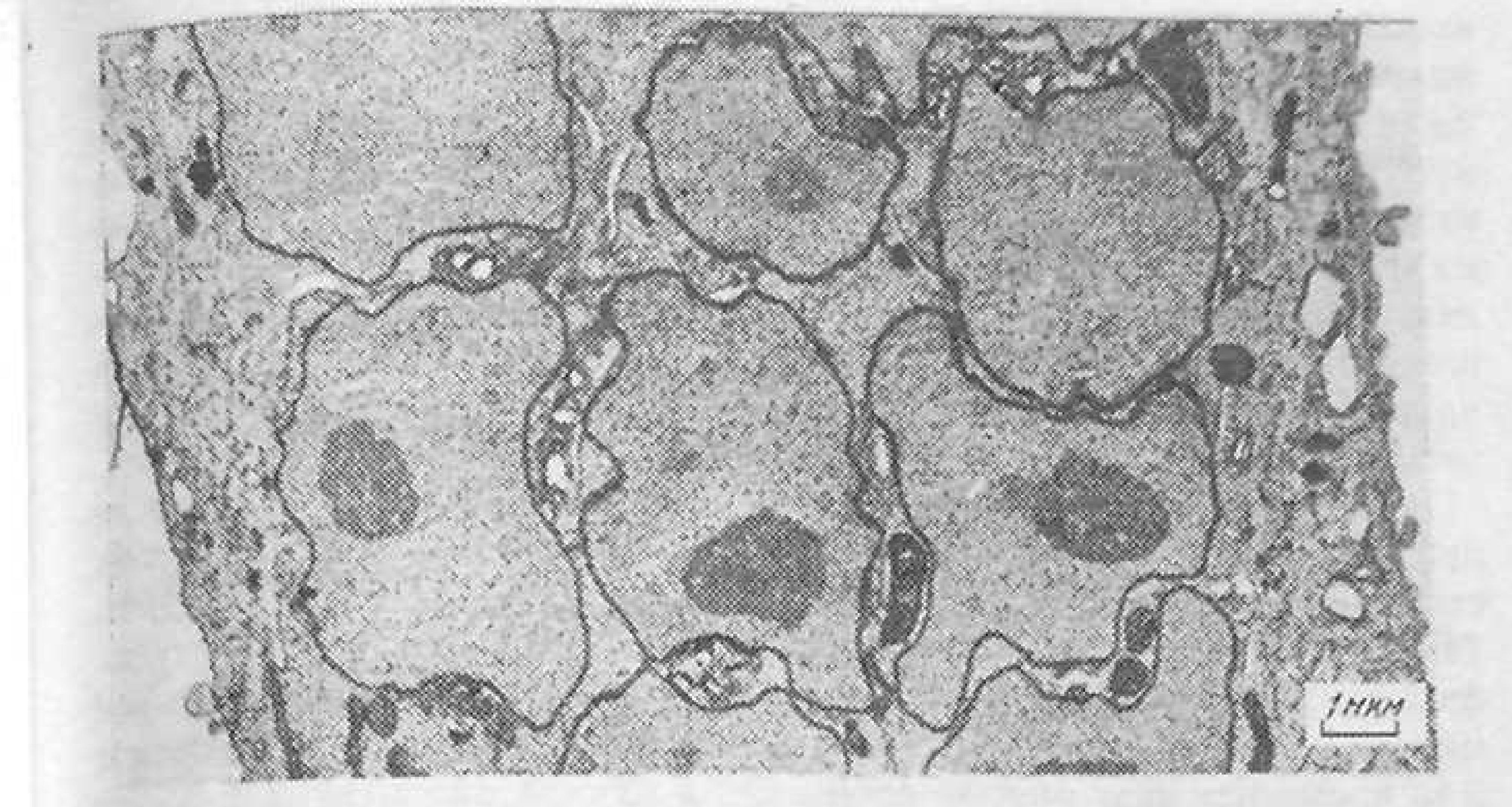


Рис. 103. Неорганизованное скопление ядер в миосимпласте из суспензии (Керкис, Исаева, 1983)

ми крупных агрегатов, остальное же пространство заполнено сетью дифференцирующихся миотуб на фоне одноядерных клеток (рис. 102, б).

Было проведено сравнение ультраструктуры клеток и миосимпластов в однослойной культуре (Керкис, Исаева, 1981а), в суспензии, а также после перевода агрегатов из суспензии в однослойную культуру (Керкис, Исаева, 1918б, 1983; Исаева, Керкис, 1988).

В однослойной культуре ядра в миотубах располагаются, как правило, цепочкой вдоль их краев, тогда как центральная часть занята вполне сформированными пучками миофибрилл с четкой исчерченностью. При большем увеличении видны типичные для дифференцированных мышечных клеток трубочки Т-системы и цистерны саркоплазматического ретикула, образующие характерные для зрелого мышечного волокна контакты – триады. Показателем высокой степени дифференцированности миотуб является способность их к спонтанным сокращениям в условиях культуры.

Для миосимпластов из суспензии характерны отсутствие типичной для дифференцированных миотуб упорядоченной пространственной организации всех субклеточных структур, слабое и неполное проявление комплекса морфологических признаков мышечной дифференцировки.

Степень выраженности ультраструктурных признаков мышечной дифференцировки в миосимпластах из суспензии весьма разнообразна, варьируя от проявления всего комплекса признаков, характерных для дифференцированного мышечного волокна, до отсутствия экспрессии каких-либо иных, кроме многоядерности, морфологически различимых черт мышечной дифференциации. В последнем случае многочисленные ядра в симпластах располагаются неупорядоченными скопле-

ниями (рис. 103). В разных частях миосимпласта морфологическое выражение мышечной дифференцировки может сильно различаться: в одной части некоторых миосимпластов присутствуют вполне дифференцированные поперечно-исчерченные миофибриллы, типичные для мышечных клеток мембраны Т-системы, характерные для скелетно-мышечного волокна митохондрии с плотным матриксом и плотно упакованными параллельными кристами, другая же его часть выглядит как участок фибробластоподобной клетки с развитым аппаратом Гольджи, светлыми удлиненными митохондриями и крупными вакуолями, морфологически весьма сходными с секреторными гранулами фибробластов.

В миосимпластах из суспензии на общем слабом фоне проявления признаков дифференцированного мышечного волокна возможна разная степень выраженности отдельных ультраструктурных черт миогенеза. Так, можно наблюдать беспорядочно разбросанные в цитоплазме пучки филаментов, в каждом из которых заметна характерная для скелетной мышцы упаковка толстых и тонких нитей, четко выявляемая на срезах, в то время как саркомерная организация пучков отсутствует. В подобных симпластах наряду с наличием пучков миофиламентов наблюдаются некоторые другие черты дифференциации мышечного типа: элементы Т-системы и саркоплазматического ретикулума, митохондрии "мышечного" типа. Более полная выраженность дифференциации миофибрилл проявляется в наличии Z-линии в некоторых (но не всех) пучках филаментов, при этом возможно неупорядоченное пространственное расположение отдельных пучков (рис. 104).

Нарушение нормальной пространственной организации на ультраструктурном уровне вообще наиболее характерно для миогенеза в суспензионной культуре: это и расположение пучков миофибрилл кольцеобразно вокруг ядра (Керкис, Исаева, 1983; Исаева, Керкис, 1988), и "завихрения" миофибрилл в цитоплазме миогенных клеток (рис. 105).

Характерный для дифференцированного мышечного волокна комплекс ультраструктурных признаков с многократно описанной типичной пространственной организацией всех структур найден лишь при определенных условиях в крупных клеточных агрегатах, центральная часть которых занята хондроцитоподобными клетками и внеклеточным матриксом с коллагеновыми волокнами. Именно на таком коллагеновом субстрате располагаются наиболее дифференцированные миосимпласты наружного слоя агрегата, характеризующиеся хорошо выраженной саркомерной организацией, развитыми тубулярной и саркоплазматической системами, удлиненными и упорядоченно расположенными митохондриями "мышечного" типа, удлиненными ядрами с хорошо выраженным примембранным хроматином и ориентацией всех структур вдоль длинной оси миосимпласта (см.: Керкис, Исаева, 1981б).

Разная степень дифференциации пучков миофиламентов и организации их в саркомеры, вплоть до развития упорядоченной саркомерной зоны с сопутствующим развитием Т-системы и саркоплазматической сети наблюдалась не только в многоядерных симпластах, но и в одноядерных клетках агрегатов. Таким образом, в суспензионной культуре наблюдает-

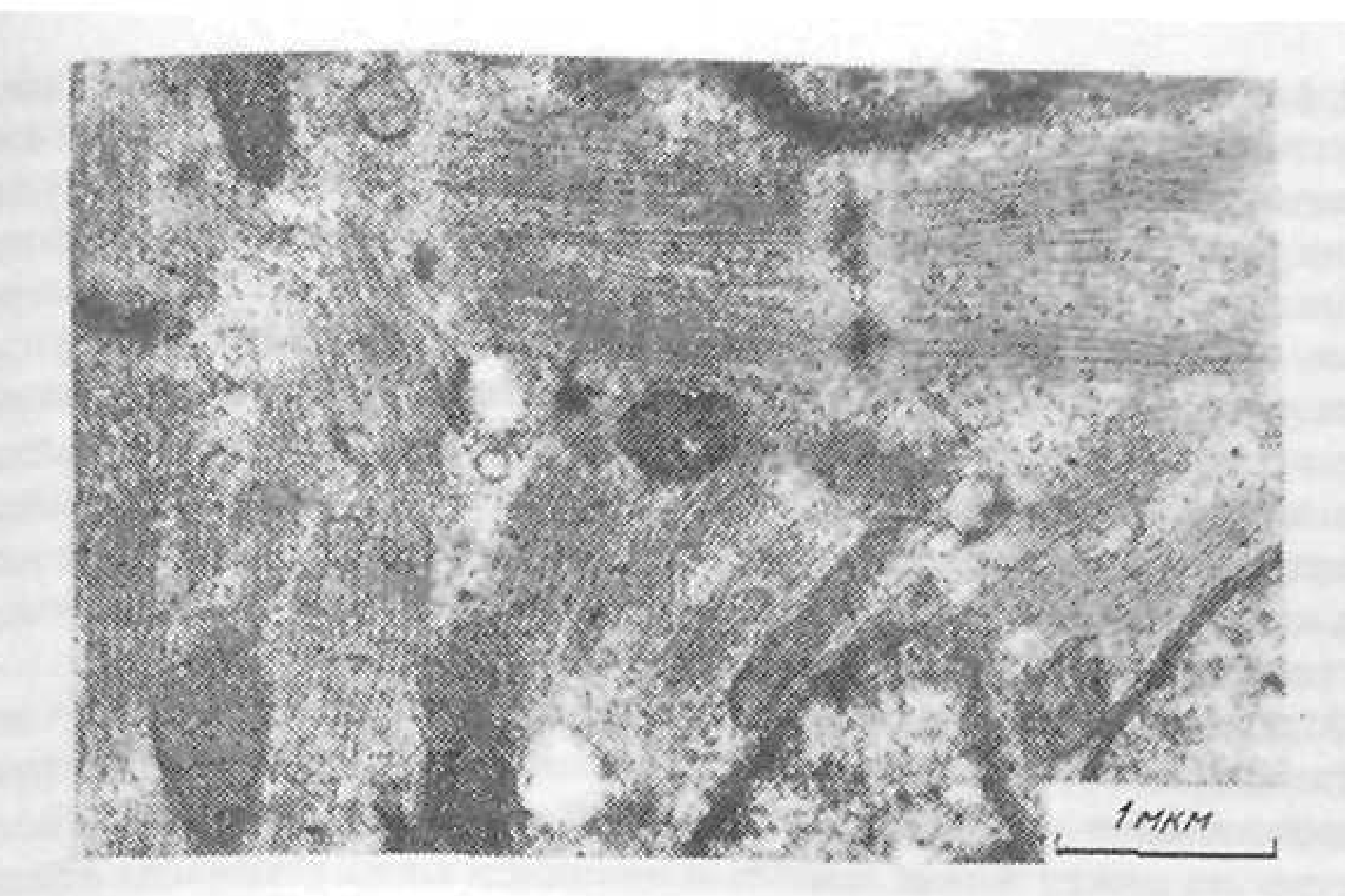


Рис. 104. Неупорядоченность пространственной организации миофибрилл в миосимпласте суспензионной культуры (Керкис, Исаева, 1983)

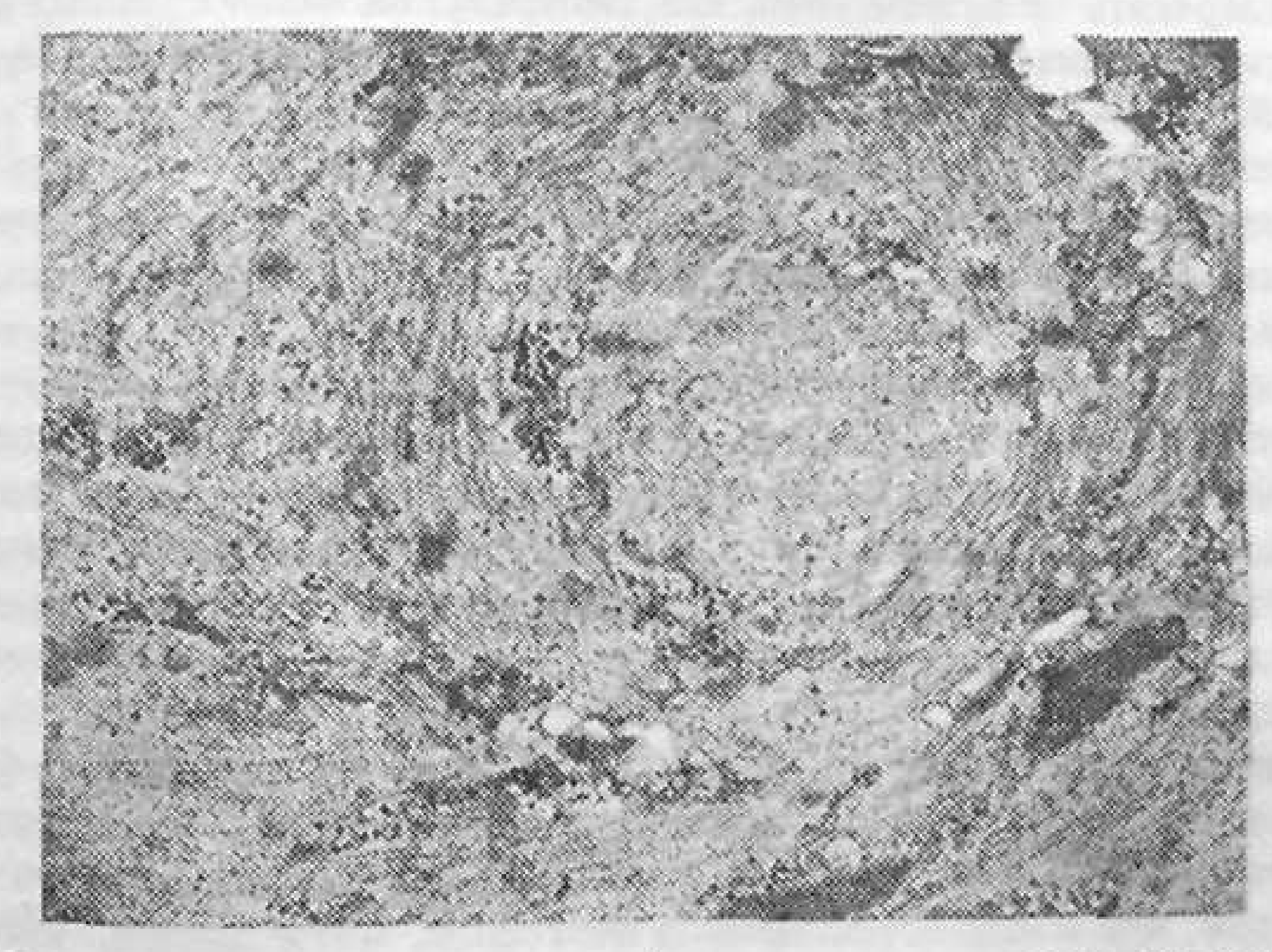


Рис. 105. Кольцеобразное расположение филаментов в цитоплазме миосимпласта суспензионной культуры (Керкис, Исаева, 1983)

ся и нарушение нормальной временной последовательности этапов миогенеза: появление одноядерных клеток с дифференцированной саркомерной зоной.

В цитоплазме миосимпластов из суспензии микротрубочки очень малочисленны, промежуточные филаменты образуют околоядерную сеть (Исаева, Керкис, 1988).

В крупных агрегатах из суспензионной культуры под симпластическим наружным слоем (см. рис. 99, 100) располагаются одноядерные

клетки двух-трех четко отличающихся друг от друга типов. В первую очередь следует упомянуть фибробластоподобные клетки, сходные с фибробластами соединительной ткани. Они обладают комплексом морфологических черт, присущих активно секретирующим дифференцированным фибробластам: большое ядро с четким ядрышком, развитый аппарат Гольджи, гладкий и гранулярный эндоплазматический ретикулум, большое число секреторных гранул, занимающих иногда значительную часть цитоплазмы. Сходство не ограничивается морфологией; как показали данные электронной радиоавтографии, такие клетки интенсивно включают ^{3}H-пролин, являющийся полуспецифическим индикатором синтеза коллагена, волокна которого часто хорошо видны вокруг таких клеток (см.: Керкис, Исаева, 1981б).

В центральной части агрегата располагаются клетки, сходные с хондробластами, причем можно обнаружить целый ряд клеток с промежуточной морфологией – от фибробластоподобных до хондроцитоподобных. Центр агрегата между этими клетками заполнен межклеточным веществом, основным компонентом которого являются коллагеновые волокна. В него вкраплены отдельные клетки, морфологически сходные с хондроцитами дифференцированного хряща. Клетки с мышечной морфологией в этой зоне агрегата не встречаются. Для центральной части крупных агрегатов весьма характерны и клетки, напоминающие адипоциты (Керкис, Исаева, 1981б).

В течение первых суток после перевода из суспензии в условия вторичной однослойной культуры миосимпласты прикрепляются к стеклу, распластываются и движутся с образованием на переднем, ведущем крае симпласта псевдоподиальных выростов (см. рис. 101). При электронно-микроскопическом исследовании таких движущихся миосимпластов не обнаружено характерных для миотуб черт ультраструктурной организации. Морфологически многоядерные симпласты вскоре после прикрепления к субстрату представляют собой распластанный мультиполярный синцитий с фибробластоподобной ультраструктурой. Ядра в таком синцитии, как правило, сосредоточены в центральной части, иногда очень близко друг от друга.

На ведущем крае движущихся миосимпластов найдены пучки филаментов, сходные со стресс-фибриллами и подмембранными пучками микрофиламентов фибробластов, однако отличающиеся от типичных стресс-фибрилл тем, что в них появляются уплотнения, являющиеся, по-видимому, первым этапом формирования Z-дисков. В удлиненной части миосимпласта, примыкающей к ведущему краю и также лишенной ультраструктурных черт дифференцированной миотубы, выявлены подмембранные пучки филаментов, многочисленные продольно-ориентированные микротрубочки, здесь же параллельно микротрубочкам располагаются ряды промежуточных филаментов. В зоне скопления ядер появляются пучки миофиламентов с электронно-плотными телами формирующихся Z-дисков (см.: Исаева, Керкис, 1988).

В течение последующих 2–3 суток культивирования миосимпласты во вторичной однослойной культуре удлиняются и дифференцируются в миотубы с типичной ультраструктурой.

Суспензионная культура миогенных клеток представляет собой весьма привлекательную модель для изучения дифференцировки клеток в трехмерных агрегатах, допускающих бо́льшую по сравнению с однослойной культурой полноту клеточных взаимодействий и частичную имитацию тканевой организации. Миогенные клетки образуют в суспензионной культуре агрегаты с тканеподобным, упорядоченным расположением клеток, существенно отличающихся по фенотипу как друг от друга, так и от исходных клеток (Керкис, Исаева, 1981б). Клеточный агрегат суспензионной культуры миогенных клеток можно рассматривать как своеобразную саморегулирующуюся систему. Упорядоченная тканеспецифическая рассортировка клеток в агрегатах, образовавшихся из диссоциированных эмбриональных клеток разных типов, описана в классических работах Москоны (Moscona, 1956) и Гольтфретера (Holtfreter, 1965). Степень гистотипической организованности в подобных клеточных агрегатах может быть очень высока. Проведенный нами электронно-микроскопический анализ агрегатов суспензионной миогенной культуры также показал большое морфологическое разнообразие клеток, составляющих агрегаты, однако в данном случае различные типы клеток возникают из относительно однородной исходной клеточной популяции.

Исходная клеточная суспензия, полученная в результате диссоциации бедренных мышц 11-суточных куриных зародышей, неизбежно содержит фибробласты, доля которых может достигать 20% (Hauschka, Konigsberg, 1966); вполне возможна примесь хондрогенных клеток. Клетки всех четырех линий дифференцировки, обнаруженных в суспензионных агрегатах (миобласты, фибробласты, хондробласты, адипобласты), как известно, возникают из общего ствола мезодермальных клеток; детерминация миогенной клеточной линии зависит от ключевых событий их жизненной истории (см. выше). Одним из экспериментальных доказательств близости этих дифференцировок служит выделение фенотически нестабильной клональной линии клеток тератокарциномы, дающей миогенные, фиброадипогенные и фибробластические клоны (Darmon et al., 1981). Есть данные о детерминации клеток миогенной линии в параксиальной мезодерме еще до образования сомитов, однако различные экспериментальные воздействия, в частности, ретиноевой кислотой могут вызвать переключение от миогенеза к хондрогенезу (см.: Chen, Solursh, 1991).

В суспензии миогенных клеток организованное расположение в агрегатах клеток различного типа возникает, вероятно, и в результате рассортировки исходной смеси разных клеток, и вследствие изменения нормальной дифференцировки части клеток в исходной клеточной популяции. Возможность селективной пролиферации мезенхимных клеток-предшественников с последующей дифференциацией в хрящевые и жировые клетки в центральных частях агрегатов кажется маловероятной, так как митотическая активность клеток агрегатов не слишком высока и непродолжительна и составляет 1,6% через 24 ч и 0,5% через 4 сут. Показано также, что в агрегатах смешанных хондрогенных и миогенных клеток доля дифференцирующихся по мышечному типу клеток всегда оказывается ниже, чем этого следовало бы ожидать исходя из их начальной

пропорции, а небольшая примесь миогенных клеток вообще не выявляется в виде дифференцированных клеток этого типа даже при длительных сроках культивирования (Moscona, 1956; Moscona, Moscona, 1952). Возможность дифференцировки миобластов по хондрогенному пути продемонстрирована в массовой культуре мышечных клеток на костном субстрате (Nogami, Urist, 1974; Anderson, Grines, 1977).

Способность миогенных клеток к хондрогенезу убедительно доказана использованием клонированных миобластов (Nathanson, 1977). На клонированных миогенных клетках скелетной мышцы в однослойной культуре получены поразительные фенотипические изменения: превращение миогенных клеток в морфологически и биохимически неотличимые от фибробластов, хондроцитов и жировых клеток (Abbott et al., 1974; Schubert, Lacorbiere, 1976; Lipton, 1977; Nathanson, 1977). Большинство этих изменений мышечных клеток – модуляции, т.е. обратимые изменения фенотипа, не сопровождающиеся потерей способности к миогенезу (Lipton, 1977).

Учитывая совокупность приведенных данных, мы допускаем возможность превращения миобластов в агрегатах из суспензии в клетки, фенотипически идентичные или подобные фибробластам, хондроцитам и жировым клеткам. В трехмерных клеточных агрегатах суспензионной культуры возрастает роль клеточных взаимодействий и создается анизотропия условий в наружных и внутренних частях агрегатов. Вероятно, внутри агрегатов создаются условия, способствующие превращению малодифференцированных миогенных клеток в фибробластические и хондрогенные. Известно, что выбор хондрогенного или миогенного направления дифференциации мезенхимными клетками сомитов или почки конечности эмбриона во многом зависит от условий культивирования. Например, достижение определенной "критической массы" (Grobstein, 1965) клеточного материала способствует хондрогенезу (Ellison et al., 1969; Flickinger, 1974, 1976). Условия гипоксии также стимулируют хондрогенез (Ellison et al., 1969). Нельзя не отметить, что и скученность клеток, и гипоксия характерны для центральных частей крупных агрегатов, где мы наблюдали наибольшую концентрацию хондроцитоподобных клеток. В наших опытах "эффект массы" достаточно ярко проявляется в морфогенезе агрегатов разных размеров из суспензионной культуры миогенных клеток. Вероятно, при определенных условиях нарушается реализация "мышечной" генетической программы и происходит переключение на программу хондрогенеза. В пользу подобного предположения свидетельствуют опыты по превращению миобластов в клетки, неотличимые по морфологии и синтезу специфических продуктов от фибробластов под действием бромдезоксиуридина – вещества, способного изменить генную экспрессию.

Возможность превращения миобластов в фибробластоподобные клетки показана как на первичных миогенных культурах, так и на клонированных миобластах при обработке их бромдезоксиуридином – аналогом тимидина, включащимся в ДНК (Bishoff, Holtzer, 1970; O'Neill, Stockdale, 1972; Adamo, Molinaro, 1976; Turner et al., 1976; Lipton, 1977a, b). Оказалось,

что фибробластоподобные клетки миогенного происхождения по своей ультраструктуре, а также функциональным характеристикам (синтез и секреция коллагена) не отличаются от фибробластов соединительной ткани (Lipton, 1977a, b). Известно, что без добавления эмбрионального экстракта к питательной среде в первичной миогенной культуре наблюдались подавление слияния миобластов и образование миотуб (Haba, Amudsen, 1972; Ramirez, Aleman, 1972), однако детальнее фенотип миогенных клеток на такой неполной среде не был изучен. Проведено электронно-микроскопическое исследование модификации фенотипа миогенных клеток, становящихся фибробластоподобными в среде без эмбрионального экстракта и сохраняющими способность к миогенезу после перевода их на полную среду (Керкис, Исаева, 1981а). Весь комплекс ультраструктурных признаков таких клеток, а также наличие коллагеноподобных фибрилл в межклеточном пространстве свидетельствуют о том, что это активно функционирующая фибробластоподобная клетка, лишенная каких-либо морфологических признаков экспрессии миогенеза. Ультраструктура миогенных клеток на среде без эмбрионального экстракта сходна с морфологией клеток, полученных Липтоном обработкой бромдезоксиуридином (Lipton, 1977a); вполне вероятно, что модуляция фенотипа миогенных клеток, растущих на "бедной" среде, связана с изменением экспрессии генома, что обусловлено отсутствием необходимых для миогенеза факторов, источником которых в клеточной структуре служит эмбриональный экстракт.

Иная ситуация возникает при миогенезе в суспензионной культуре. В данном случае клетки обеспечены полной питательной средой с добавлением сыворотки крови и эмбрионального экстракта. Такая среда в однослойной культуре допускает полноценную экспрессию миогенеза вплоть до развития сокращающихся миотуб. Условия культивирования миогенных клеток в суспензии (во вращаемых флаконах) отличаются лишь отсутствием возможности прикрепления клеток к твердому субстрату. Слияние миобластов в суспензионной культуре не подавлено, однако существенно нарушена пространственная организация миогенеза на клеточном и субклеточном уровнях.

Слияние миобластов с образованием округлых миосимпластов (myoballs, myosacs) с атипичной клеточной и субклеточной архитектурой без развития миотуб наблюдалось в различных условиях культивирования, общей чертой которых является невозможность прикрепления к твердому субстрату: при культивировании на неадгезивном для клеток субстрате (Lass, Fischbach, 1976; Knudsen, Horwitz, 1977; Fischbach, Lass, 1978; Puri, Turner, 1978; Puri et al., 1980) и во вращаемой суспензии (Исаева, 1979; Керкис, Исаева, 1981б, 1983; Исаева, Керкис, 1988), тогда как в контрольных однослойных культурах дифференцируются способные к сокращению зрелые миотубы. Известно, что форма клеток и ее изменения определяются цитоскелетом, опорно-двигательной системой клетки и перестройка, специализация цитоскелета, играет очень существенную, если не ключевую роль в процессах цитодифференциации и, в частности, в миогенезе. Поддержание типичной удлиненной трубковидной формы миотуб

зависит прежде всего от организации системы микротрубочек: разрушение микротрубочек колхицином или колцемидом приводит к превращению нормальных миотуб в мышечные мешки с неорганизованно лежащими ядрами (Bischoff, Holtzer, 1967; Warren, 1974; Fukuda et al., 1976; Holtzer et al., 1985; Hill et al., 1986; Saitoh et al., 1988).

Мышечные мешки отличаются от нормальных миотуб отсутствием микротрубочек (Fukuda et al., 1976; Saitoh et al., 1988) и дезорганизацией саркомерной зоны (Fukuda et al., 1976; Hill et al., 1986). Подобные черты строения миосимпластов из суспензии найдены и нами. На основании этих данных можно предположить, что атипичная форма и отсутствие нормальной упорядоченной субклеточной архитектуры обусловлены нарушением формирования цитоскелетных структур, служащих основой для организованного миофибриллогенеза. Предположение об организующей роли цитоскелетных элементов в сборке миофибрилл уже было высказано (Fulton, 1981). Экспериментально показана на культивируемых сердечно- и скелетно-мышечных клетках возможность постепенного замещения структур, подобных стресс-фибриллам, развивающимися в тесной ассоциации с ними миофибриллами (Dlugosz et al., 1984; Holtzer et al., 1985a, b; Antin et al., 1986).

В свою очередь подавление нормальной сборки и организации микротрубочек, микрофиламентов и других элементов цитоскелета в суспензионной культуре обусловлено, вероятно, невозможностью прикрепления к твердому субстрату in vitro, дающему механическую опору и обеспечивающему натяжение миосимпластов, необходимое для ориентированной сборки элементов цитоскелета. Стимулирующая и ориентирующая роль механического натяжения в миофибриллогенезе экспериментально доказана на культивируемых скелетно-мышечных клетках (Vandenburgh, 1982, 1983). При невозможности прикрепления к твердому субстрату в миосимпластах пучки миофибрилл оказываются закрученными вокруг ядер, что уже было ранее отмечено у скелетно-мышечных симпластов (Puri et al., 1980) и сердечно-мышечных клеток (Bechem et al., 1985), или других субклеточных структур, вероятно становящихся в таком случае неким каркасом, опорой для сборки пучков миофибрилл.

Характерными чертами миосимпластов из суспензии являются неупорядоченность ультраструктурной организации миосимпластов, слабая выраженность и разобщенность проявления отдельных признаков цитодифференцировки, нарушение последовательности этапов миогенеза. Нарушение нормальной временной последовательности этапов миогенеза, т.е. независимое проявление черт дифференцированного мышечного волокна, наиболее четко выражено в разобщении слияния миобластов в миосимпласты и экспрессии остальных морфологических признаков мышечной дифференциации. Если при нормальном миогенезе слияние миобластов предшествует миофибриллогенезу, то при некоторых экспериментальных условиях в миогенных клеточных культурах возможны разобщение этих двух процессов и дифференциация саркомеров в одноядерной клетке (Delain, 1975; Adamo, Molinaro, 1976; Nameroff, Merlie, 1976; Trotter, Nameroff, 1976). В суспензионной миогенной культуре мы наблюдали появление и одноядерных клеток с дифференцированной саркомерной зоной, и многоядерных миосимпластов, лишенных остальных мышечных признаков, а также экспрессию отдельных ультраструктурных признаков миогенеза (пучки миофиламентов, митохондрии "мышечного" типа, элементы Т-системы) в разной мере, вплоть до полной дифференцировки всего комплекса типичных для мышечного волокна структур.

Независимое и неполное проявление некоторых признаков цитодифференциации отмечено в однослойных культурах миогенных клеток и в опухолях мышечного происхождения (Фридлянская, 1972; Вахтин, 1974, Вахтин, Швембергер, 1981), а также у гибридов клеток нейробластомы или гепатомы с другими соматическими клетками (Рингерц, Сэвидж, 1979). Подобно признакам миогенеза, проявление отдельных черт цитодифференциации у гибридных клеток нейробластомы может быть неполным, ступенчатым; наблюдается как независимая экспрессия некоторых отдельных признаков, так и координированное проявление всего набора их (Minna et al., 1972). Разнообразие проявлений отдельных черт мышечной дифференцировки в суспензионной культуре миогенных клеток сходно с наблюдаемым у злокачественных миобластов спектром отклонений от нормального миогенеза (Вахтин, Швембергер, 1981). Атипичность проявлений миогенеза у злокачественных миобластов обусловлена наследуемыми на клеточном уровне изменениями, тогда как нарушения миогенеза в суспензионной культуре носят характер модуляций и обратимы, т.е. представляют собой своеобразные "фенокопии" наследственных изменений, описанных для малигнизированных клеток миогенного происхождения. Совокупность приведенных фактов свидетельствует о возможности в экспериментальных условиях раздельного, независимого контроля экспрессии некоторых признаков цитодифференцировки и поэтапной регуляции их проявления.

В суспензионной культуре миогенных клеток миобласты агрегируют и сохраняют способность к репродукции и последующему слиянию в миосимпласты. Известно, что нормальные, нетрансформированные клетки, как правило, не способны к репродукции in vitro без прикрепления к искусственному твердому субстрату; это правило справедливо и для миобластов (Kauffman, Parks, 1977). Однако в агрегатах клетки делятся в условиях суспензионного культивирования. Описана также пролиферация в агрегатах клеток 3Т3 (Carrino, Gerschman, 1977); можно присоединиться к заключению авторов о создании в трехмерных клеточных агрегатах условий, заменяющих прикрепление клеток к искусственному твердому субстрату, а также об отсутствии в агрегатах контактного ингибирования деления клеток. Однако слияние миобластов в суспензионной культуре ведет к возникновению атипичных сферических или пузыревидных миосимпластов. Близкая к нормальной дифференциация саркомеров найдена лишь в крупных агрегатах с хорошо развитым внеклеточным коллагеновым матриксом (известно, что коллаген стимулирует миогенез: Hauschka, Konigsberg, 1966; Haba et al., 1975); при этом высокая степень мышечной дифференциации связана с координированным прояв-

лением этих признаков и типичной пространственной организацией всех структур. Неполная, частичная экспрессия мышечной дифференцировки в миосимпластах суспензионной культуры может вызываться блокированием миогенеза на различных его этапах в условиях отсутствия подходящего для прикрепления миогенных клеток субстрата.

Обнаружено, что прикрепление клеток или их агрегатов к твердому субстрату – необходимое условие дифференциации по крайней мере некоторых типов клеток или клеточных систем in vitro: "эмбриоидных тел" тератокарциномы (Gearhart, Mintz, 1974; Jack et al., 1975), клеток нейробластомы (Zucco et al., 1975) и ранних мышиных эмбрионов (Pienkowski et al., 1974). В частности, прикрепление агрегатов клеток тератокарциномы стимулирует дифференцировку их по миогенному пути (Gearhart, Mintz, 1974). Есть данные (Puri et al., 1980), что в миогенной культуре при невозможности прикрепления к субстрату электрофоретически обнаруживаются все основные белки, свойственные дифференцированным мышечным клеткам, однако конечные этапы миогенеза, связанные с дифференциацией миотуб, не осуществляются. Возможно, ключевую роль в реализации терминальных этапов миогенеза играют зависимые от контакта с субстратом или другими клетками изменения плазматической мембраны и связанных с ней элементов цитоскелета, организующих сборку и расположение миофибрилл (Puri et al., 1980). Однако при определенных экспериментальных условиях (обработка канцерогеном) возможно и нарушение нормальной координации синтеза мышечных белков (Holtzer et al., 1986b). Более того, на первичной культуре миогенных клеток куриного зародыша показано, что для экспрессии по крайней мере одной из специфических изоформ мышечных белков (тяжелой цепи миозина) необходима сократительная активность миотуб (Cerny, Bandman, 1986), т.е. необходимо и механическое натяжение миотуб как чисто физическое условие сокращения.

После прикрепления миосимпластов из суспензии к твердому субстрату упорядочение субклеточной пространственной организации проявляется сначала в ориентации по продольной оси удлиняющегося миосимпласта возникающих заново микротрубочек и подобной же ориентации промежуточных филаментов и подмембранных пучков микрофиламентов.

Наличие структур, подобных стресс-фибриллам немышечных фибробластоподобных клеток, коррелирует с немышечным типом подвижности миосимпластов в этот период. В ходе нормального миогенеза перестройка организации цитоскелета с переходом от немышечного типа к скелетно-мышечному с соответствующей сменой форм сократительных белков в результате включения экспрессии набора "Мышечных" генов происходит вслед за слиянием миобластов в миосимпласты. Переход от немышечной организации цитоскелета к типичной для зрелых миотуб происходит в течение 1–2 сут после перевода миосимпластов из суспензии в условия однослойной культуры, что дает возможность наблюдения немышечного типа подвижности миосимпластов вскоре после их прикрепления к твердому субстрату. Такого рода подвижность миосимпластов в условиях культивирования ранее наблюдалась как весьма редкое и случайное событие (Wilde, 1959; Cooper, Konigsberg, 1961).

Описано также развитие цитоскелетных структур движущихся миосимпластов, возникающих из миосаков после прекращения действия колцемида или нокодазола (Saiton et al., 1988). На растущем конце миосимпласта появляются прежде всего микротрубочки и десминовые филаменты; подобные стресс-фибриллам пучки актиновых филаментов располагаются в некотором отдалении от вершины симпластического отростка. Эти данные, полученные техникой иммунофлуоресценции, а также применением родаминфаллоидина, привели авторов к заключению об ответственности микротрубочек за удлинение миотубы (Saitoh et al., 1988), что вполне согласуется с результатами других исследований роли цитоскелетных структур в морфогенезе миотуб.

Лишь после перевода клеток из суспензионной культуры в однослойную и их прикрепления к субстрату развиваются нейриты клеток нейробластомы (Zucco et al., 1974), стимулируется миогенез мультипотентных стволовых клеток тератокарциномы (Gearhart, Mintz, 1974), атипические массивные миосимпласты превращаются в нормальные мышечные волокна. Контакт клеток с твердым субстратом играет в этих случаях роль триггера процессов цитодифференциации, связанных с существенным изменением клеточной морфологии.

Твердый субстрат, очевидно, дает механическую опору, обеспечивая прикрепление и натяжение миосимпластов; сборка же элементов цитоскелета – микротрубочек и микрофиламентов, по-видимому, зависит от локальных механических напряжений (Лучинская, Белоусов, 1977; Белоусов, Мещеряков, 1986; Kolega, 1986b). В крупных агрегатах миогенных клеток, достигших определенной "критической массы", создается достаточный для натяжения миосимпласта клеточной субстрат и тем самым условия дальнейшего морфогенеза и дифференциации поперечно-исчерченной саркомерной зоны.

Элементы цитоскелета немышечного типа могут служить основой для морфогенеза организованной саркомерной зоны, как это показано в других экспериментальных условиях на скелетно- и сердечно-мышечных клетках (Dlugocz et al., 1984; Holtzer et al., 1985a, b; Antin et al., 1986). Мы полагаем, что в использованной нами экспериментальной системе цитоскелет миосимпластов подобным образом организует сборку постепенно замещающего его опорно-сократительного аппарата дифференцированных миотуб. Возможно, в построении цитоскелета немышечного типа принимают участие немышечные изоформы сократительных белков (присутствующие не только в миобластах, но и в дифференцированных клетках скелетных и сердечных мышц наряду со специфичными мышечными изоформами) (например: Otey et al., 1988; Conrad et al., 1991) и переход к саркомерной организации сопряжен со сменой изоформ сократительных белков.

Итак, фенотипическое проявление признаков дифференциации у культивируемых скелетно-мышечных клеток весьма лабильно и зависит от условий культивирования; сравнение миогенеза в организме и в клеточ-

ной культуре позволяет приблизиться к пониманию факторов, контролирующих экспрессию миогенеза на субклеточном, клеточном и надклеточном уровнях организации. Ключевыми событиями в контроле экспрессии миогенеза оказываются контактные реакции клетка–субстрат и клетка–клетка, тогда как факторы жидкой питательной среды необходимы, но не достаточны для полноценной мышечной дифференцировки. Отсутствие возможности прикрепления к ригидному субстрату, обеспечивающему опору и тем самым условие для механического натяжения миосимпластов, не препятствуя агрегации и слиянию миобластов, ведет к поразительному изменению цитоархитектоники: вместо миотуб появляются сфероидные симпласты, практически лишенные микротрубочек, вместо линейной саркомерной зоны – завихрения пучков миофиламентов. Зависимость нормальной экспрессии миогенеза от прикрепления к ригидному субстрату подтверждается и превращением симпластов из суспензии в миотубы после перевода в однослойную культуру.

Ригидный субстрат необходим для дифференцировки миотуб – однако пространственное расположение миотуб контролируется дополнительными позиционными сигналами. В однослойной культуре миогенных клеток однородная, равномерная адгезивность искусственного двумерного субстрата приводит к двумерности возникающих морфогенетических паттернов, появлению ламеллярных миосимпластов, ветвлению миотуб, образованию мультиполярных миосимпластов с аберрантным неоднородным паттерном исчерченности, зависящим, по-видимому, от механического натяжения симпласта одновременно в нескольких различных направлениях. В свою очередь изотропная адгезивность субстрата in vitro определяется, вероятно, равномерным распределением адсорбированных из жидкой питательной среды, содержащей сыворотку крови и эмбриональный экстракт, лигандных молекул внеклеточного матрикса, прежде всего молекул фибронектина. Показано, что фибронектин опосредует прикрепление миобластов in vitro; антитела к фибронектину почти полностью блокируют прикрепление миобластов; обычным источником фибронектина в клеточных культурах служит сыворотка крови (см.: Turner, Gibralter, 1985).

В экспериментальных условиях позиционную информацию о пространственном расположении миобластов и миотуб дают физические граничные условия – плоскости и линии, ограничивающие прикрепление и перемещение миобластов. В однослойной культуре биполярных миогенных клеток очень ясно выражена контактная ориентация. На субстратах с параллельной исчерченностью миобласты ориентируются вдоль борозд[ок] поверхности; существенно снижается число ветвлений миосимпластов по сравнению с культурами на ровной поверхности. Определяемое физическими ориентирами субстрата упорядоченное расположение клеток поддерживается и усиливается двумя типами взаимной клеточной ориентации: параллельной (бок о бок) и последовательной (конец в конец). Параллельная ориентация мышечных волокон на субстратах с упорядоченным микрорельефом имитирует ориентацию, наблюдаемую в скелетной мышце in vitro (хотя в организме и ригидный субстрат, и позиционная информация о пространственной организации миогенеза – от направления миграции миобластов до паттерна дефинитивных мышечных волокон – обеспечиваются трехмерным клеточным и внеклеточным окружением – см. выше).

Упорядоченное расположение клеток и миотуб параллельно краю стекла-подложки поддерживаются на расстоянии до 200 мкм (12–18 рядов клеток); в данном случае позиционная информация, заданная физическим ограничителем, передается путем межклеточных взаимодействий (контактной параллельной ориентацией клеток). Премитотическая контактная ориентация миобластов вдоль бороздок поверхности субстрата-подложки или вдоль миотуб поддерживается у биполярных делящихся клеток в течение всего митоза и сохраняется у дочерних клеток, что может служить механизмом поддержания упорядоченного расположения миобластов и направленного роста как in vitro, так и in vivo.

Отсуствие в однослойной культуре каких-либо линейных ориентиров, контролирующих и упорядочивающих пространственную организацию миогенных клеток, допускает возможность самоорганизации, структурирования потоков движущихся миобластов с возникновением новых пространственных паттернов, не встречающихся в организме и сходных с узорами дерматоглифики. Образование таких паттернов обусловлено игрой межклеточных взаимодействий – контактного ингибирования движения и контактной параллельной ориентации клеток, а также значительно более общими, топологическими ограничениями, что подробнее рассмотрено в гл. VI.

Глава V

МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК: ЦЕЛОМОЦИТОВ И ГЕМОЦИТОВ

Морфогенез на уровне отдельной клетки можно рассматривать вслед за Уоддингтоном (1964) как цитодифференциацию одиночной клетки, что вполне традиционно в цитологии и протозоологии. Иной подход предложен Ю.М. Васильевым (Васильев, Гельфанд, 1981; Vasiliev, 1982, 1987) – взгляд на процессы морфогенеза на клеточном уровне как контактно-обусловленные реакции на искусственный субстрат при культивировании соматических клеток in vitro, а также как межклеточные взаимодействия (Trinkaus, 1984; Lackie, 1986). Оба аспекта клеточного морфогенеза – и необратимый, подобный или идентичный цитодифференциации, и обратимые реакции на клеточное и неклеточное окружение – можно исследовать на клетках целомической и (или) гемальной жидкостей тела иглокожих и моллюсков. Это клетки "быстрого реагирования", осуществляющие защитные реакции в организме иглокожих и моллюсков, подобно значительно более изученным клеткам крови позвоночных животных. У всех этих клеток ярко выражены защитно-морфологические реакции клетка–клетка и клетка–субстрат (инородное тело).

Многоклеточные животные сохраняют свою индивидуальность и целостность, защищаясь от внешних (инфекции, ранения) и внутренних (остатки разрушенных клеток, злокачественные клетки) повреждающих факторов. В основе сохранения целостности организма лежит фундаментальное свойство живого – способность различать свое (себя) и инородное (Купер, 1980; Coombe et al., 1984; Azzolina et al., 1985; Cooper, 1985; Ratcliff et al., 1985; Фонталин, 1988). Система защиты включает клеточные и гуморальные механизмы. Поскольку клеточные реакции – средство защиты целостности организма на базе распознавания инородного, термин "иммунокомпетентность" применим к целомоцитам и гемоцитам беспозвоночных животных (Купер, 1980; Azzolina et al., 1985; Sminia, Van der Knaap, 1986, 1987).

Гемоциты и целомоциты выполняют в организме беспозвоночных животных разнообразные функции, в том числе защитные, осуществляемые путем фагоцитоза, агглютинации (агрегации) клеток, инкапсуляции инородного тела (Заварзин, 1976, 1982; Купер, 1980; Шмидт-Ниельсон, 1982). Защитные функции целомоцитов иглокожих проявляются и в первичной репарации раны, а также в участии в трансплантационном иммунитете. Помимо защитных реакций, целомоцитам приписывается участие в трофической (внутриклеточное пищеварение, запасание и транспорт питательных веществ), экскреторной и дыхательной функциях (см.: Исаева, Коренбаум, 1989).

Изучение иммунитета иглокожих заслуживает особого внимания, так как они, в отличие от большинства беспозвоночных, являются вторичноротыми животными, и поэтому их систему клеточной защиты можно рассматривать в качестве предковой по отношению к иммунной системе позвоночных. У иглокожих имеется три типа жидкостей тела: целомическая, гемальная и жидкость амбулакральной системы; все они содержат качественно один и тот же набор клеток, которые принято называть целомоцитами (Andrew, 1965; Endean, 1966; Smith, 1981; Karp, Coffaro, 1982; Kanungo, 1982, 1984; Ratcliffe et al., 1985). Наиболее обычны и общи для всех классов иглокожих три типа целомоцитов: лейкоциты (называемые также амебоцитами), морулярные клетки, пигментированные или бесцветные (именуемые также морулами, клетками-морулами, сфероносными клетками, элеоцитами, клетками-сферулами) и подвижные жгутиковые (или вибрирующие) клетки (Endean, 1966; Johnson, 1969a; Chien et al., 1970; Karp, Coffaro, 1982; Kanungo, 1984). Клетки последнего типа, по-видимому, недавние производные целомического эпителия, вероятного источника всех или некоторых типов целомоцитов (Holland et. al., 1965; Van den Bossche, Jangoux, 1976).

Активно фагоцитирующими клетками из целомоцитов иглокожих оказались лишь лейкоциты (амебоциты) (Johnson, 1969a,b; Bang, 1975; Bertheussen, Seijelid, 1978; Huysecom et al., 1983; Coombe et al., 1984). В этом отношении амебоциты иглокожих функционально подобны лейкоцитам позвоночных (Купер, 1980). Экспериментально показана способность амебоцитов к фагоцитозу in vitro бактерий (Johnson, 1969b), к пиноцитозу in vivo инородных белков и фагоцитозу инородных клеток, инъецированных в целом (Bang, 1975; Coombe et al., 1984; Ratcliffe et al., 1985). Целомоциты морских ежей активно фагоцитируют грам-положительных бактерий, скопления которых оказываются окруженными множеством целомоцитов (Johnson, 1969b); такая реакция сходна с воспалительной и одновременно близка к инкапсуляции инородного тела.

Объекты, которые вследствие больших размеров не могут быть фагоцитированы, окружаются целомоцитами и инкапсулируются. Реакции фагоцитоза и инкапсуляции фундаментально сходны: распластывание клеток при инкапсуляции можно представить как попытку поглощения слишком крупного объекта (Nappi, 1975; Dybas, Fankboner, 1986). В инкапсуляции бактериальных масс участвуют как лейкоциты, так и морулярные клетки, причем освобождаемый красными морулярными клетками пигмент – эхинохром вызывает быструю потерю подвижности бактерий (Johnson, 1969b). Паразитирующие в целомической полости морских ежей грегарины оказываются покрытыми прикрепленными к их поверхности поляризованными целомоцитами, каждый из которых образует на обращенном в целомическую полость полюсе длинный вырост, цитоскелетной основой которого служит пучок микрофиламентов. Цисты же грегарин заключены внутри так называемых коричневых телец, состоящих из сгустка пигментированного материала, на поверхности которого расположены клетки мезотелия (De Ridder, Jangoux, 1984).

У голотурий паразиты и инородные тела оказываются окруженными

капсулой из многих слоев уплощенных лейкоцитов, сферулярные же (морулярные) целомоциты обеспечивают фенолоксидазную активность и меланизацию (Canicatti, 1992). У голотурии Parastichopus californicus инкапсуляции может предшествовать агглютинация бактерий; морулярные клетки, участвующие в инкапсуляции, подвергаются дегрануляции и выделяют в агрегировавшую массу бактерий кислую фосфотазу (Dybas, Fankboner, 1986). Гемоциты моллюсков представлены лейкоцитами одного или чаще двух-трех типов клеток, номенклатура которых не унифицирована, а *гистогенетические связи практически не* исследованы (см.: Купер, 1980; Bayne, 1981; Fisher, 1986). Среди двустворчатых моллюсков (Bivalvia) гемоциты так или иначе исследованы у мерценарии Mercenaria mercenaria, устриц Ostrea edulis, Crassostrea virginica и C. gigas, тридакны Tridacna maxima, мидии Mytilus edulis (см.: Fisher, 1986, а также см. ссылки ниже), приморского гребешка Mizuhopecten yessoensis (Исаева, Подгорная, 1984; Korenbaum et al., 1990) и анадары Anadara broughtoni (Подгорная, Исаева, неопубл. данные).

На основании морфологических особенностей прикрепленных и распластанных in vitro гемоцитов у исследованных двустворчатых моллюсков выделяют два или три типа гемоцитов: наиболее обычно разделение на гранулоциты (амебоциты) и агранулоциты, иначе называемые гиалиноцитами, лимфоцитами (обзоры: Herberts, 1978; Fisher, 1986). Гемоциты гребешка в однослойной культуре морфологически однотипны, что не исключает, конечно, весьма вероятной гетерогенности популяции гемоцитов в организме и отбора клеток какого-либо одного типа при использованных условиях выделения и культивирования.

Некоторые авторы выделяют среди гемоцитов двустворчатых моллюсков клетки, сходные с тканевыми фибробластами: десмобласты (Заварзин, 1953) или фиброциты (Foley, Cheng, 1974); Эти же авторы отмечают отсутствие четких критериев, отличающих фибробластоподобные элементы гемолимфы от гранулоцитов (амебоцитов). Получены экспериментальные свидетельства возможности превращения амебоцитов моллюсков в фибробластоподобные элементы при инкапсуляции инородного тела (Заварзин, 1953; Sminia et al., 1974); показано, что амебоциты жемчужницы Pinctada fucata, способны не только к инкапсуляции инородного тела in vivo, окружая его 10–12 слоями клеток с внеклеточным матриксов между ними, но и к формированию in vitro внеклеточного матрикса, содержащего коллаген, возможно, протеогликаны (Suzuki et al.,1991) и фибронектин (Suzuki, Funakoshi, 1992).

В большинстве работ, выполненных на гемоцитах моллюсков in vitro, выделение и культивирование клеток гемолимфы использованы для морфологического изучения этих клеток и идентификации их типов, а также с целью исследования фагоцитоза – наиболее изученной защитной реакции, осуществляемой гемоцитами моллюсков как в организме, так и вне его (обзоры: Herberts, 1978; Купер, 1980; Bayne, 1981; Fischer, 1986). Меньшее внимание уделено изучению защитно-морфогенетических контактных реакций гемоцитов: агрегации клеток, прикреплению клеток к искусственному субстрату и клеточной подвижности in vitro, а также

репарации повреждений, инкапсуляции и воспалению in vivo (обзор: Fisher, 1986). Совсем редки попытки найти общее объяснение проявлениям защитно-морфогенетических реакций гемоцитов in vivo и in vitro (Brewster, Nicolson, 1979; Купер, 1980). Однако анализ поведения целомоцитов и гемоцитов в модельных системах in vitro может способствовать и пониманию функций этих клеток в организме, и объяснению общих механизмов контактных клеточных реакций.

КОНТАКТНО-ЗАВИСИМАЯ МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ЦЕЛОМОЦИТОВ МОРСКОГО ЕЖА

Морфология лейкоцитов морского ежа in vitro вариабельна; в качестве основных форм можно выделить петалоидные (с лепестковидными образованиями поверхности) (рис. 106,*а*), фило- и ламеллоподиальные (ламеллярные) формы клеток. Петалоидные и филоподиальные формы лейкоцитов описывались некоторыми авторами как отдельные клеточные типы, однако после исследования Эддса (Edds, 1977, 1980, 1984) стало ясно, что морфологическая трансформация одной формы лейкоцитов в другую обусловлена перестройками цитоскелета.

Контактно-зависимая филоподиальная трансформация лейкоцитов морского ежа после их прикрепления к субстрату in vitro, описанная Эддсом Edds, 1977, 1980, 1984), наблюдалась и на лейкоцитах Strongylocentrotus nudus (рис. 106, *б*). Помимо чисто филоподиальных форм лейкоцитов, одновременно встречались также распластывающиеся лейкоциты с ламеллами, и промежуточные ламеллярно-филоподиальные формы (рис. 106,*в*, *г*).

Цитохалазин В или D (1–5 мкг/мл) подавлял филоподиальную и ламеллярную трансформацию лейкоцитов, их прикрепление к субстрату и перемещение.

Наблюдалась и не описанная ранее контактно-зависимая морфофункциональная трансформация двух других типов целомоцитов: морулярных клеток (см. ниже) и так называемых жгутиковых (вибрирующих клеток – мелких сферических клеток с длинным жгутиком (рис. 107,*а*), благодаря биению которого они совершают быстрые скачущие движения в целомической жидкости или морской воде. Учитывая характер подвижности этих клеток – не поступательное движение, а скачки, рывки без существенного продвижения клетки, – их следует именовать моноцилиарными, т.е. клетками с ресничкой, а не с жгутиком.

В морской воде с добавлением сыворотки эти клетки после контакта с искусственным субстратом быстро теряют свою единственную ресничку, прикрепляются к субстрату (рис. 107,*б*) и распластываются по нему, переходя в амебоидную форму (рис. 107,*в*). Потеря реснички происходит практически немедленно после контакта с субстратом и прикрепления к нему – среди клеток на субстрате моноцилиарные формы очень редки. Переход от сферической формы к распластанной амебоидной осуществляется в течение 1–2 ч, через несколько часов появляются мультиполярные формы с филоподиями и ламеллами, сходные с лейкоцитами, но меньшего размера.

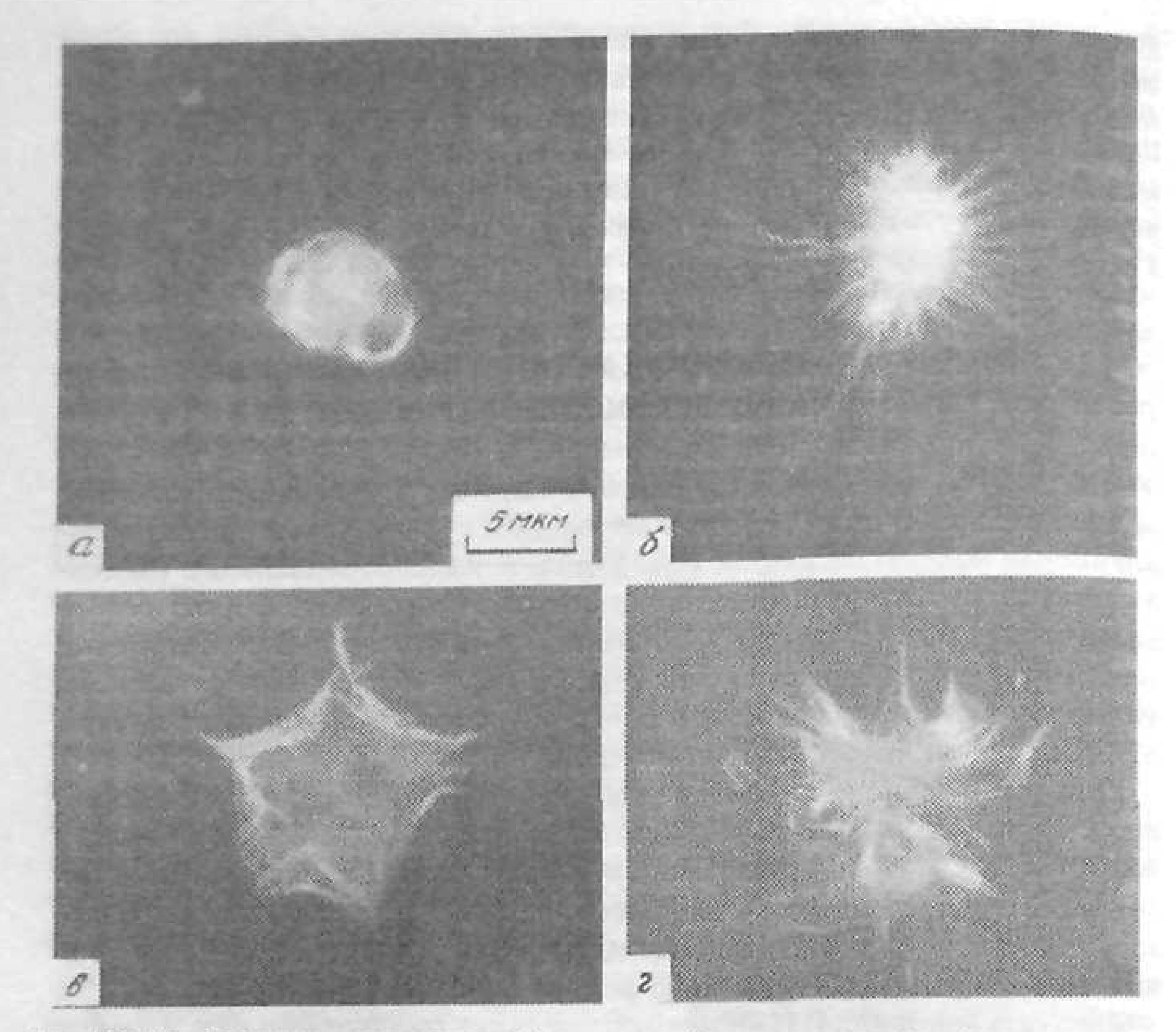


Рис. 106. Морфофункциональная трансформация лейкоцитов морского ежа

а – петалоидная форма; б – филоподиальная форма; в, г, – ламеллярно-филоподиальные формы (родаминфаллоидин)

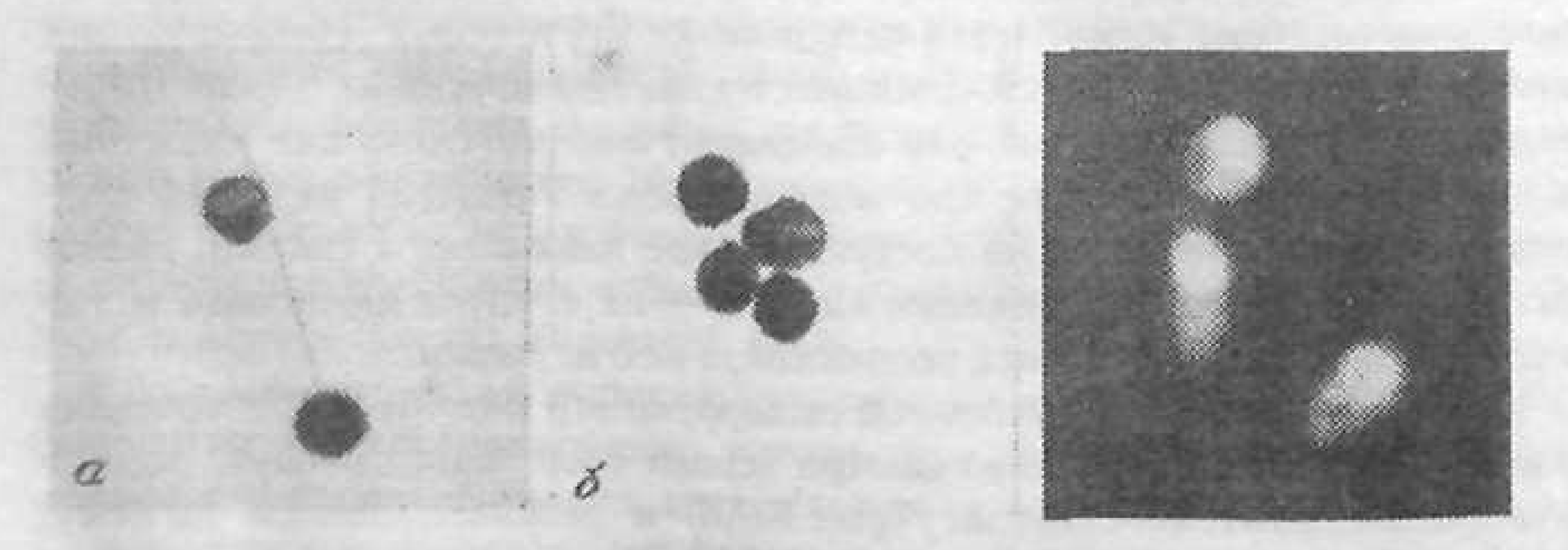


Рис. 107. Морфофункциональная трансформация моноцилиарных целомоцитов в амебоциты

а – исходная моноцилиарная клетка; б – утрата реснички после контакта с субстратом; в – амебоидная форма тех же клеток (в – родаминфаллоидин)

Трансформация моноцилиарных клеток в амебоидные происходит и в морской воде без сыворотки, но значительно медленнее: подвижные жгутиковые формы сохраняются в течение нескольких (5–8) часов.

Добавление цитохалазина В или D (1–5 мкм/мл) полностью подавляет трансформацию моноцилиарных форм в амебоидные: в среде с цитохалазином (как с сывороткой, так и без нее) клетки остаются подвижными, цилиарными в течение одних-двух суток.

Перестройки цитоскелета при морфологической трансформации, обнаруженные у целомоцитов морского ежа (Edds, 1977, 1980, 1984; Otto et al., 1979), найдены также у гемоцитов некоторых членистоногих (см.: Заварзин, 1985; Goldenberg et al., 1986). Актиновому цитоскелету принадлежит ведущая роль при морфологической трансформации в процессе распластывания целомоцитов. Рыхлая сеть актиновых филаментов петалоидных целомоцитов морского ежа преобразуется в короткие пучки микрофиламентов, которые постепенно удлиняются и утолщаются, образуя стержни будущих филоподий (Edds, 1977, 1980). Изучение перераспределения фасцина (белка, сшивающего актин в пучки) в целомоцитах морского ежа при трансформации показало наличие двух популяций функционально различных молекул; одна стабильно локализована в перинуклеарной зоне, тогда как другая диффузно распределена в тонком слое периферической цитоплазмы, перераспределяясь при трансформации так, что в дальнейшем его локализация полностью совпадает с положением образующихся пучков актиновых филаментов филоподий (Otto et al., 1979).

В организации актиновых пучков принимает участие белок, гомологичный спектрину эритроцитов, и калмодулин (Edds, Venuti-Henderson, 1983; Venuti, Edds, 1986). Зависимость морфологической трансформации целомоцитов от сборки актиновых филаментов показана в экспериментах с цитохалазином. Цитохалазин подавлял морфологическую трансформацию лейкоцитов морского ежа (Edds, 1980 и наши данные), аналогичный эффект получен на пластинках крови человека (Casella et al., 1981). По нашим данным, цитохалазин подавляет морфофункциональную трансформацию морулярных и моноцилиарных клеток. Микротрубочки почти никогда не встречаются в периферической цитоплазме нетрансформированных клеток и в области формирующихся филоподий; клетки могут прикрепляться, распластываться, трансформироваться в филоподиальную форму в отсутствие микротрубочек при обработке колцемидом (Edds, 1984).

При морфофункциональной трансформации целомоцитов Strongylocentrotus nudus возникали не только филоподиальные, но и ламеллоподиальные формы, что можно объяснить повышением адгезивности субстрата в результате адсорбции лигандных молекул, источником которых служит сыворотка среды. Эти лигандные молекулы, вероятно, оказываются триггером процесса реорганизации актинового цитоскелета и в итоге – морфологической трансформации клетки.

Моноцилиарные целомоциты, по-видимому, происходят из целомического эпителия и являются вероятными предшественниками всех или некоторых форм зрелых целомоцитов (Holland et al., 1965; Van den Bossc-

he, Jangoux, 1976). Наблюдавшееся превращение цилиарных клеток в амебоидные (морфологически неотличимые от лейкоцитов) подтверждает эту возможность, однако для доказательства такой трансформации необходимы дальнейшие исследования на чистых популяциях моноцилиарных целомоцитов.

Как известно, у одноклеточного организма Naegleria в зависимости от условий среды наблюдается превращение амебоидной формы в жгутиковую (Willmer, 1956, 1958). Подобная амебофлагеллярная трансформация с соответствующей перестройкой актинового и микротрубочкового цитоскелета найдена у клеток Physarum polycephalum на одной из стадий жизненного цикла этого плазмодиального миксомицета (Ohta et al., 1991). Моноцилиарные целомоциты морских ежей (Strongylocentrotus nudus и *Echinocardium cordatum*) претерпевают обратную, цилиарно-амебоидную трансформацию с сопутствующей перестройкой актинового и микротрубочкового цитоскелета (неопубликованные данные совместно с А.М. Керкисом.)

Преобразование моноцилиарных целомоцитов в амебоидные, обратное трансформации, широко известной для Naegleria и недавно исследованной у клеток Physarum, также может быть использовано в качестве модельной системы для исследования морфофункциональной клеточной *трансформации, вовлекающей существенную реорганизацию системы* микротрубочек и актиновых филаментов.

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ И ТРОМБОЦИТАРНАЯ ФУНКЦИЯ КРАСНЫХ МОРУЛЯРНЫХ КЛЕТОК МОРСКОГО ЕЖА

На целомоцитах морского ежа была описана агглютинация клеток с образованием их агрегата (Johnson, 1969a,b), морфологическая трансформация с появлением многочисленных радиальных филоподий (Edds, 1977, 1980, 1984) и необратимая "взрывная" реакция сгусткообразования (Boolotian, Giese, 1959). Не было ясно, осуществляются эти реакции одним или разными типами целомоцитов. Защитная реакция свертывания в виде образования клеточного сгустка найдена у целомоцитов ("взрывных" клеток, фагоцитов) морского ежа in vitro (Boolotian, Giese, 1959; Johnson, 1969a), но не морулярных клеток. Последние вследствие значительно большего, чем у других целомоцитов, размера и пигментированности клетки и ее отростков представляют собой удобный объект для исследования морфологической трансформации и сгусткообразования, что и было сделано нами (Подгорная, Исаева, 1985); ранее функционирование морулярных клеток как тромбоцитов не было описано.

После выделения целомической жидкости из организма в зависимости от физиологического состояния морских ежей наблюдали или немедленную, протекающую в течение 1–3 мин реакцию сгусткообразования с разрушением клеток-морул и окрашиванием целомической жидкости в красно-бурый цвет вследствие дисперсии пигмента, или медленную, асинхронно протекающую реакцию. Быстрое сгусткообразование происходило при взятии целомической жидкости у ежей в период нереста. Медленно протекающую реакцию наблюдали у клеток целомической жидкости, взятой у морских ежей примерно месяц спустя после окончания нереста.

Культивируемые в морской воде или в воде с сывороткой морулы отнерестившихся ежей, как правило, сохраняют исходную, близкую к сферической форму (рис. 108) и почти неподвижны. Лишь у немногих клеток образуются небольшие тупые лобоподии. Как показала покадровая съемка с интервалами 15 мин в течение 4–6 ч, лобоподии медленно, кругообразно перемещаются по периферии клетки, не вызывая ее поступательного продвижения. Не выявлено деления морул (возникновения пар дочерних клеток). При более длительном (в течение 2–3 сут) культивировании отдельные морулы приобретают распластанную звездчатую форму. Большинство же клеток остается по-прежнему сферическими и слабо прикрепленными к дну чашек, что отличает морулы от целомоцитов в параллельных культурах: среди целомоцитов преобладают клетки, распластанные по дну чашек. В морской воде с добавлением гетерологической сыворотки межклеточная адгезия преобладает над адгезией клеток к субстрату, большинство морул, взвешенных в среде поодиночке или в составе небольших агрегатов, располагаются у дна чашек, но не прикрепляются.

Добавление к среде (морской воде или морской воде с сыровоткой) тритона Х-100 в концентрации 0,05% вызывало немедленную, массовую и *почти синхронно протекающую (что удобно для наблюдения) морфологи*ческую трансформацию морул: появление и быстрый рост по периферии клеток тонких длинных ветвящихся филоподий, интенсивно окрашивающихся родаминфаллоидином (рис. 109, *а*). У прикрепленных к дну чашек *изолированно лежащих морул при такой трансформации возникает пра*вильной формы ореол в виде кругового распластанного по субстрату ободка (ламеллы), который через 5 мин достигает в диаметре около 40 мкм (рис. 109, *б*, 110, *а*), а через 10 мин – максимального размера 50–70 мкм (рис. 110, *б*). К этому времени почти вся цитоплазма клетки с пигментными гранулами оказывается в данном ободке, превращаясь в сеть многочисленных тонких, ветвящихся пучков фибриллярного актина; становится заметным ядро, скрытое в интактной клетке пигментом. Сетчатые цитоплазматические тяжи лежащих рядом клеток объединяются в общую массу (рис. 111, *а*). Подобные изменения протекают у взвешенных поодиночке или в агрегатах морул и в среде с сывороткой с той разницей, что филоподии возникают по всей поверхности клеток, образуя трехмерную сеть, объединяющую в сгусток соседние клетки (рис. 111, *б*).

В процессе образования сгустка цитоплазма клеток, по-видимому, разрушается, превращаясь в фибриллярную массу тромба. К этому времени ядра клеток претерпевают дегенеративные изменения: хроматин конденсируется в плотную массу, располагающуюся под ядерной оболочкой и около ядрышек, кариоплазматическая сеть исчезает. Видимое разрушение цитоплазмы, часто наблюдаемое отделение цитоплазмы от ядра и

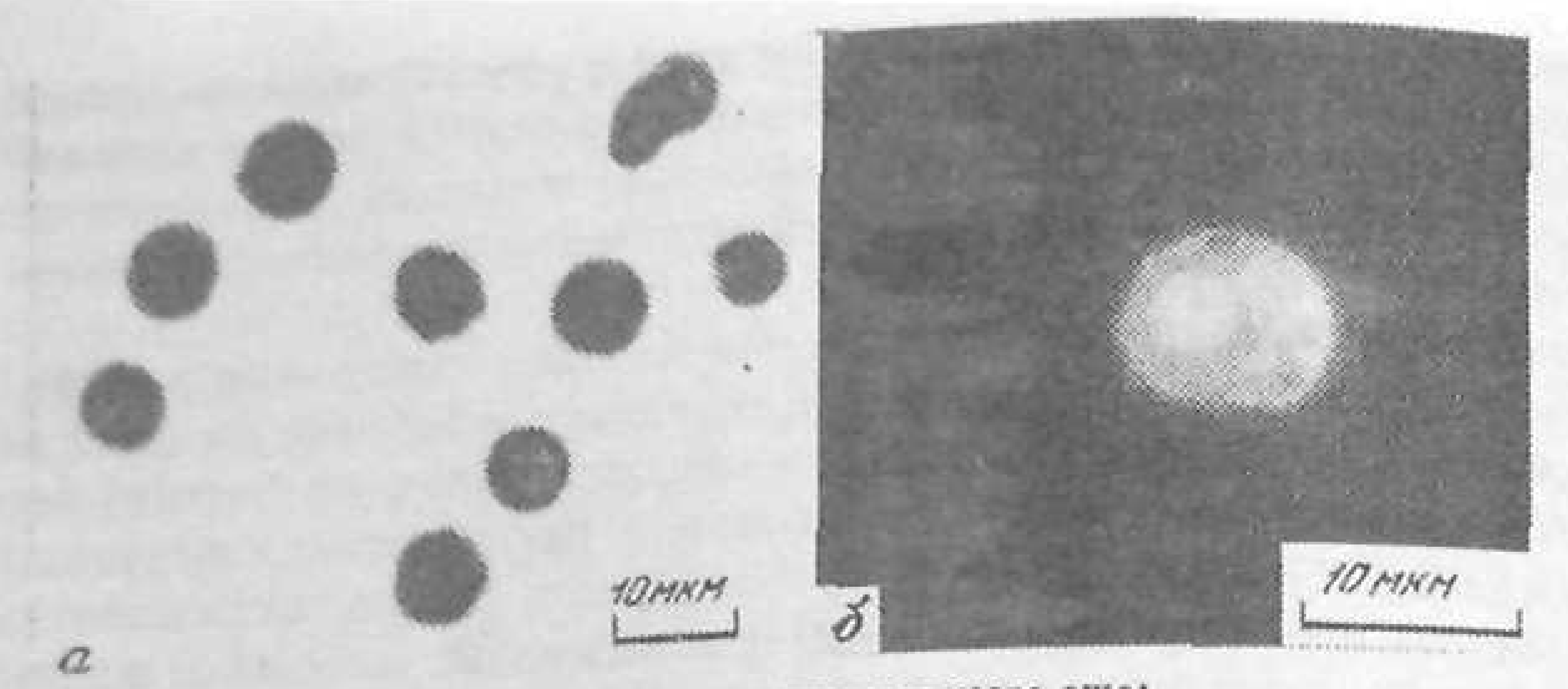


Рис. 108. Красные морулярные целомоциты морского ежа:
а — обычная морфология in vitro; б — окрашивание родаминфаллоидином

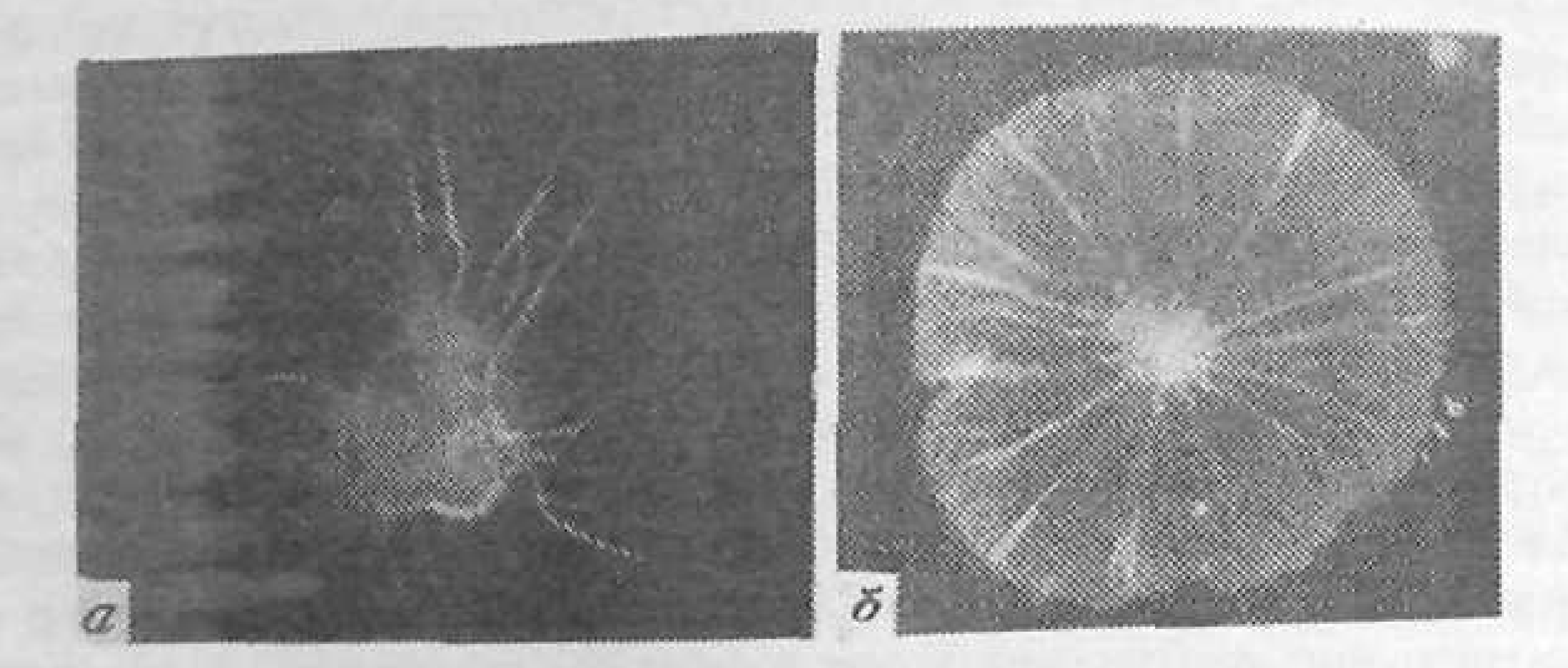


Рис. 109. Филоподиальная (*а*) и ламеллоподиальная (*б*) формы трансформированных морулярных целомоцитов (*родаминфаллоидин*)

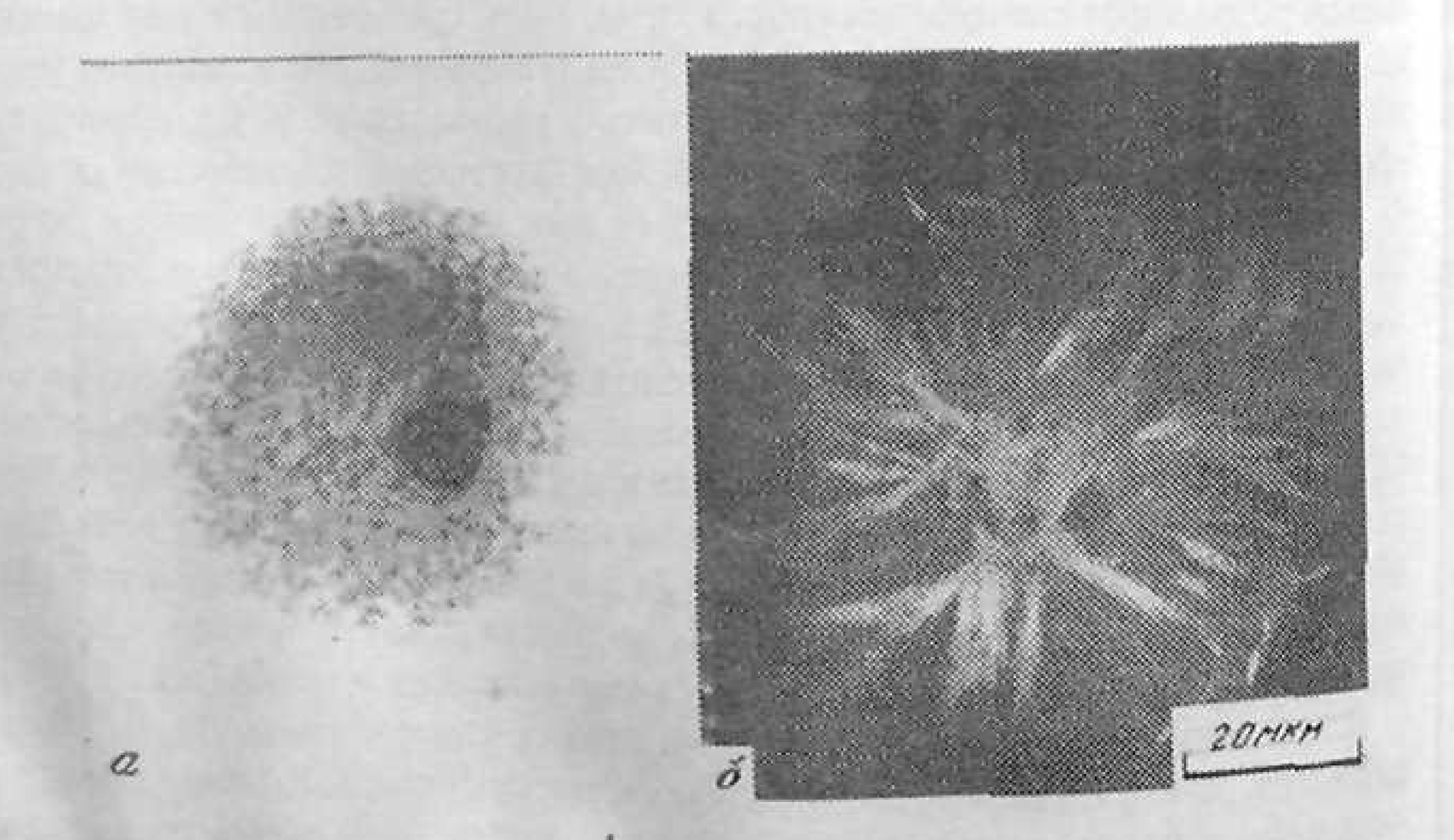


Рис. 110. Поздние этапы трансформации морулярных клеток, предшествующие их разрушению (*б* — родаминфаллоидин)

Рис. 111. Образование фибриллярного сгустка разрушающимися морулярными клетками морского ежа
а — в однослойной фазе; б — в суспензии; в — уплотнение сгустка (Подгорная, Исаева, 1985)

внутриядерные изменения свидетельствуют о необратимости трансформации морул в процессе индуцированного тритоном Х-100 тромбообразования. Тесная близость ядер в некоторых сгустках (рис. 111, в), возможно, указывает на активное сокращение сгустка, образованного трасформированной цитоплазмой нескольких клеток. В конечном итоге сгусток представляет собой сетчато–волокнистую аморфную массу с включенными в нее ядрами.

Цитохалазин В (2–5 мкг/мл) подавлял филоподиальную трансформацию морулярных клеток и дальнейшее сгусткообразование (при одновременном добавлении тритона Х-100 и цитохалазина).

Добавление тритона Х-100 в уменьшенной вдвое концентрации (0,025%) вызывало сначала филоподиальную трансформацию морулярных клеток без дисперсии пигментных гранул, т.е. образование прозрачных бесцветных филоподий с сохранением агрегированных пигментных гранул в околоядерной части клетки. Позже, в течение нескольких часов пигментные гранулы перемещались в филоподиальные отростки.

Спонтанную филоподиальную трансформацию и образование сгустка морулярными клетками наблюдали при культивировании клеток целомической жидкости отнерестившихся ежей в морской воде с гомологичной целомической жидкостью. Этот процесс отличался от реакции, вызванной тритоном Х-100, лишь асинхронностью перехода клеток в трансформированную форму и растянутостью во времени (завершение трансформации всех или почти всех клеток наблюдали через 3–4 ч). Добавление тритона Х-100 (0,05%) ускоряло процесс спонтанной трансформации и приводило к быстрому формированию тромба. Разрушение красных морулярных клеток с формированием гелеподобного сгустка после выделения целомической жидкости из организма найдено и у спатангоидного ежа Echinocardium cordatum.

Преобразования цитоскелетных структур лейкоцитов и морулярных клеток иглокожих сходны с таковыми кровяных пластинок, активация которых, связанная с установлением их контактов друг с другом или с искусственным субстратом in vitro, индуцирует морфологическую трансформацию пластинок в филоподиальную форму с сопутствующей перестройкой цитоскелета, в первую очередь полимеризацией глобулярного актина в фибриллярный и затем сборкой пучков филаментов (Lindberg, Markey, 1987). Цитоскелет неактивированных целомоцитов не был исследован, тем не менее есть основания предполагать наличие полимеризованного актина в какой-то мере и в неактивированных нетрансформированных амебоцитах, которые в петалоидной форме функционируют как фагоциты и, таким образом, сочетают свойства кровяных пластинок и макрофагов. Этапы трансформации красных морулярных клеток: их агрегация, образование филоподий, разрушение цитоплазмы и сгусткообразование – феноменологически подобны и функционально аналогичны этапам преобразования кровяных пластинок и тромбоцитов при свертывании крови у позвоночных животных.

У иглокожих описано три варианта свертывания (рис. 112): 1 – агрегация (агглютинация) клеток без потери их целостности и индивидуальности

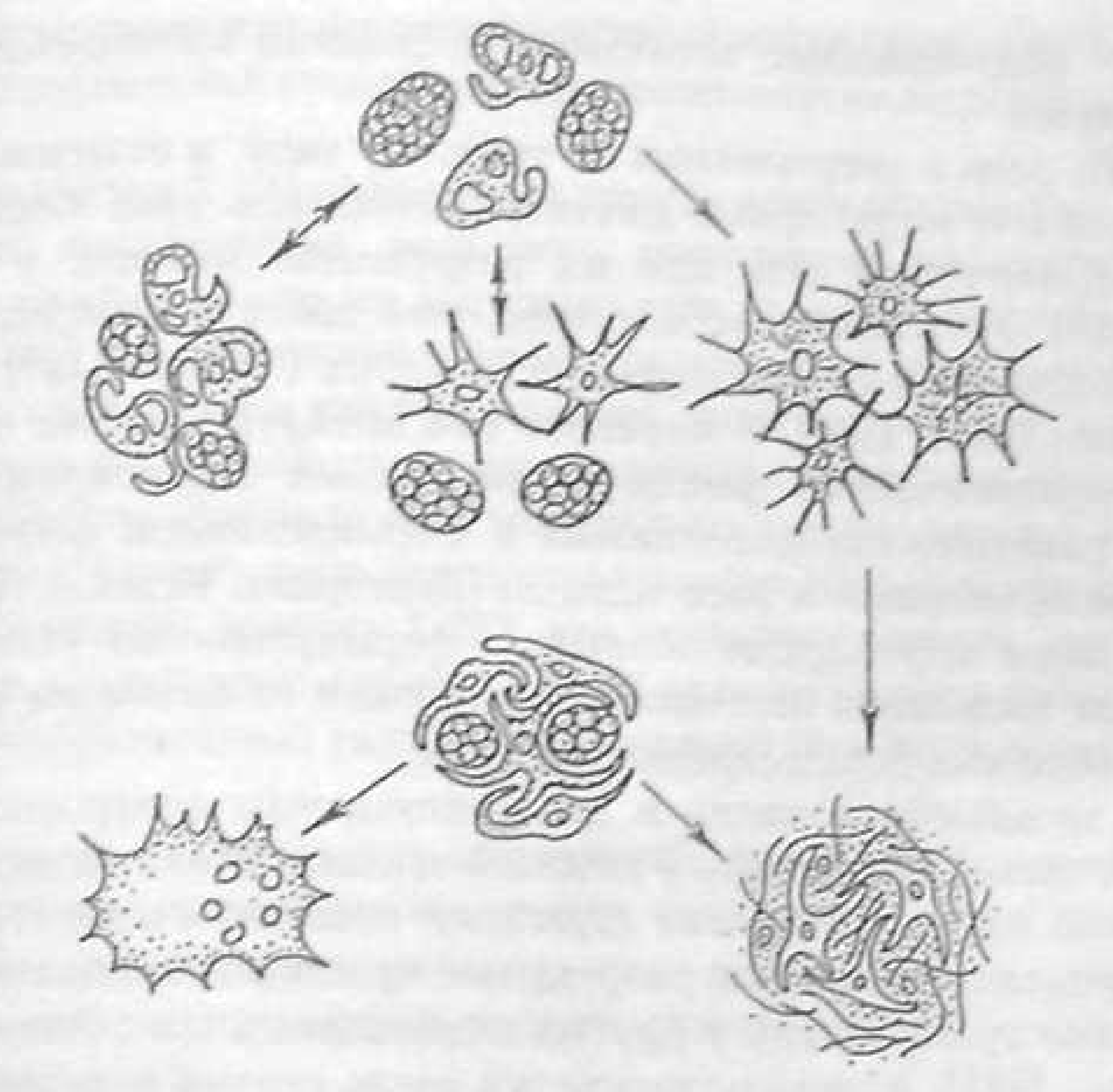


Рис. 112. Схема типов тромбообразования у иглокожих (Исаева, Коренбаум, 1989)
а – неактивированные петалоидные лейкоциты и морулярные клетки; б – рыхлый клеточный агрегат; в, г – филоподиальная трансформация целомоцитов; д – плотный агрегат клеток; е – образование синцития; ж – фибриллярный сгусток

с возможностью последующего выхода клеток из агрегата; 2 – слияние целомоцитов с возникновением синцития или плазмодия; 3 – разрушения клеток с образованием фибриллярного сгустка, в который могут быть включены и интактные клетки (Boolootian, Giese, 1959; Andrew, 1965; Smith, 1981).

Первый тип сгусткообразования обнаружен у представителей всех классов иглокожих: морских звезд (Andrew, 1965; Kanungo, 1982, 1984), морских ежей (Boolootian, Giese, 1959; Andrew, 1965; Endean, 1966; Edds, 1977), голотурий (Fontaine, Lambert, 1977), морских лилий и офиур (Boolootian, Giese, 1959; Andrew, 1965). Свертывание по первому типу осуществляется наиболее многочисленными клетками целомической жидкости – фагоцитирующими амебоцитами. Другие типы целомоцитов, видимо, не играют активной роли в агглютинации и попадают в состав агрегатов случайно. Большинство амебоцитов in vivo находится в петалоидной форме, и собственно агглютинации предшествует трансформация клеток в филоподиальное состояние, которая, видимо, запускается сдвигом физико-химического гомеостаза целомической жидкости. Первый этап свертывания – формирование рыхлого агрегата клеток – довольно легко обратим.

Слияние целомоцитов с образованием синцития или плазмодия (второй тип свертывания по Булутиану и Гизе) отмечено у морских звезд (Boolootian, Giese, 1959; Andrew, 1965), морских ежей (Anrew, 1965; Bertheussen, Seljelid, 1978) и голотурий (Andrew, 1965; Endean, 1966). Наши данные

(см. ниже) подтверждают возможность слияния лейкоцитов морского ежа в синцитии.

Ключевую роль в свертывании по третьему типу, в отличие от первых двух, выполняют морулярные клетки. Способность этих клеток образовывать фибриллярную сеть при их разрушении найдена у голотурий (Endean, 1966). У правильных морских ежей описана необратимая реакция сгусткообразования с разрушением особых ("взрывных") целомоцитов (Boolootian, Giese, 1959). У морского ежа Strongylocentrotus nudus обнаружена морфологическая трансформация красных морулярных клеток с конечным разрушением цитоплазмы и формированием фибриллярного сгустка с включенными в него ядрами (Подгорная, Исаева, 1985). Разрушение красных морулярных клеток с формированием гелеподобного сгустка после выделения целомической жидкости из организма найдено и у спатангоидного ежа Echinocardium cordatum.

Процесс тромбообразования в его эволюционно совершенной форме наиболее детально исследован у млекопитающих. Этот процесс многоэтапен, и первой фазой его служит агрегация пластинок крови; последним этапом свертывания является разрушение кровяных пластинок у млекопитающих или тромбоцитов у других позвоночных (см.: Заварзин, 1967; Хэм, Кормак, 1983). Феноменологически очень сходно формируется сгусток при тромбообразовании у некоторых членистоногих (см.: Заварзин, 1967, 1982) и морских ежей. У большинства представителей иглокожих, как и у большей части всех других беспозвоночных животных, тромбообразование ограничено морфологической трансформацией и агрегацией целомоцитов или гемоцитов. Совершенная и эффективная форма тромбообразования с разрушением красных морулярных клеток характерна для правильных и спатангоидных морских ежей. Это связано, вероятно, с невозможностью сокращения краев раны при повреждении этих животных, имеющих и относительно хрупкий панцирь (Boolootian, Giese, 1959). Итак, эволюционно совершенный механизм сгусткообразования с разрушением функционирующих как тромбоциты клеток параллельно и независимо вырабатывается у представителей отдельных групп первично- и вторичноротых животных (Заварзин, 1985).

Так как в средах, не содержащих целомической жидкости, морфологическая трансформация морулярных клеток морского ежа и сгусткообразование не происходят без дополнительного воздействия детергентом, можно предположить, что в условиях контакта жидкости с внешней средой (что имитирует повреждение организма и нарушает гомеостаз жидкости целома) активируется некий фактор, индуцирующий цепь событий, которые заканчиваются тромбообразованием (аналогично тому, что происходит при свертывании крови млекопитающих – см.: Хэм, Кормак, 1983). В процессе тромбообразования с формированием фибриллярного неклеточного сгустка у многих ежей, по-видимому, также участвует некий фактор (факторы) целомической жидкости, на что указывает существенное падение содержания азота в жидкости целома (Boolootian, Giese, 1959). Ключевым событием для запуска процессов свертывания, возможно, является реорганизация мембранных рецепторов вследствие их связывания специфическими или неспецифическими лигандами, как показано в случае филоподиальной трансформации целомоцитов морского ежа (Stephens, 1978).

Детергент тритон Х-100 повреждает прежде всего плазматическую мембрану, и это повреждение, возможно, индуцирует перераспределение рецепторов мембраны или же запускает цепь событий, ведущих к трансформации морул с какого-либо последующего этапа, вызывая в итоге ту же реакцию морулярных клеток, которая происходит в результате ранения животного и опосредована изменениями гомеостаза целомической жидкости. При инкубации in vitro морулярных целомоцитов с целомической жидкостью филоподиальная трансформация осуществляется спонтанно, без воздействия тритона Х-100, что позволяет считать искусственно вызываемую воздействием тритона Х-100 реакцию морул типичной реакцией тромбообразования, синхронизированной in vitro действием детергента.

Массовость и синхронность изменений при трансформации морул in vitro делают эти изменения процессом, удобным для изучения, а культивируемые клетки-морулы морского ежа – возможной модельной системой для исследования морфофункциональной трансформации клеток и сгусткообразования.

Итак, защитные реакции целомоцитов интегрированы с функциями гуморальных факторов. Функционально целомоциты иглокожих можно разделить на две основные группы: амебоциты (фагоциты), осуществляющие функции фагоцитоза, инкапсуляции, образования клеточного агрегата – сгустка, и гранулоциты. Гранулоциты представлены морулярными клетками и клетками с полисахаридными гранулами. При дегрануляции происходит освобождение соответственно эхинохрома или мукополисахаридов, при полном же разрушении красных морулярных клеток – образование фибриллярного тромба. Дегрануляция – типичная реакция гранулоцитов на повреждающие факторы, направленная на защиту организма. Такая реакция хорошо исследована на гранулоцитах членистоногих (см.: Bohn, 1975; Заварзин, 1982, 1985; Söderhäll, Smith, 1986). У членистоногих (за исключением мечехвоста), а также у асцидий и гидроидов гранулярные амебоциты содержат компоненты фенолоксидазной системы, освобождающиеся и функционирующие при дегрануляции (см. обзор: Чага, Соловей, 1986). Фенолоксидазная активность обнаружена в клетках целомической жидкости голотурий – лейкоцитах и сферулоцитах (клетках, подобных или идентичных морулярным) и лизате целомоцитов (Canicatti, Götz, 1991; Roch et al., 1992; Sammarco, Canicatti, 1992). Эхинохром красных морулярных клеток (полигидроксинафтохинон – Koltsova et al., 1981; Servise, Wardlaw, 1984) относится к группе фенольных соединений. Поэтому вполне вероятно, что феноменологическое сходство процессов тромбообразования у морских ежей и членистоногих базируется и на общности биохимических процессов. Известно, что эхинохром, нафтохиновый пигмент, проявляет сильный бактерицидный и бактериостатический эффект (Johnson, 1969a; Servise, Wardlow, 1984). По данным Джонсон (Johnson, 1969a), гранулы жгутиковых клеток освобождают мукополиса-

хариды, коагулирующие вокруг инородного материала. При повреждении организма и эхинохром красных морулярных клеток, и мукополисахариды жгутиковых клеток становятся защитными факторами всей целомической жидкости.

КОНТАКТНЫЕ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ ЦЕЛОМОЦИТОВ И ГЕМОЦИТОВ В ПОПУЛЯЦИЯХ IN VITRO

Хотя морфогенетические реакции целомоцитов (лейкоцитов) на клеточном и субклеточном уровнях достаточно детально исследованы, описанию паттернов пространственной организации клеточных систем, возникающих при культивировании целомоцитов иглокожих, не было уделено внимания. Пространственные паттерны, порождаемые контактными межклеточными взаимодействиями и прикреплением целомоцитов к искусственному твердому субстрату, не столь разнообразны, как в дифференцирующихся (спикулогенной и миогенной) культурах, однако заслуживают описания.

В зависимости от условий выделения целомоцитов и состава среды in vitro наблюдалось либо преобладание сгусткообразования, агрегации целомоцитов, либо их прикрепления к поверхности искусственного субстрата, распластывание и перемещение. Выделение целомической жидкости из организма животного немедленно вызывает появление сгустков. После отделения клеточных агрегатов от целомической жидкости и помещения их в чашки Петри в морскую воду с добавлением сыворотки наблюдались прикрепление агрегатов и миграция из них клеток, переходящих в однослойную фазу (рис. 113).

Выделение целомической жидкости при одновременном смешивании ее в шприце с раствором ЭДТА предотвращает сгусткообразование. Отделение клеток от целомической жидкости и посев их в чашки Петри с морской водой и сывороткой дает однослойную культуру целомоцитов, лишенную крупных клеточных агрегатов и представленную через несколько часов после посева сетью мультиполярных клеток (рис. 114, *а*). На вторые сутки культивирования многие (но далеко не все) целомоциты сливаются, образуя ламеллярные мультиполярные синцитии (рис. 114, *б*).

При выселении клеток из небольших агрегатов возникает близкий к радиальному паттерн клеточной миграции (рис. 115, *а*). Относительно равномерное расположение мелких агрегатов приводит к триангуляционному разбиению пространства между агрегатами в результате образования соединяющих их линейных мостиков (рис. 115, *б*). Между соседними агрегатами образуются клеточные мостики, состоящие из биполярных вытянутых клеток (рис. 115, *б*, *в*). Эти мостики, по-видимому, служат субстратом для перемещения других клеток, ориентирующихся вдоль мостиков, что ведет к их утолщению.

Обработка цитохалазином В или D (1–5 мкг/мл) приводит к осферированию клеток, нарушению связей между ними, превращению клеточных агрегатов и соединяющих их тяжей в рыхлую россыпь клеток, т.е. к исчезновению описанных пространственных паттернов.

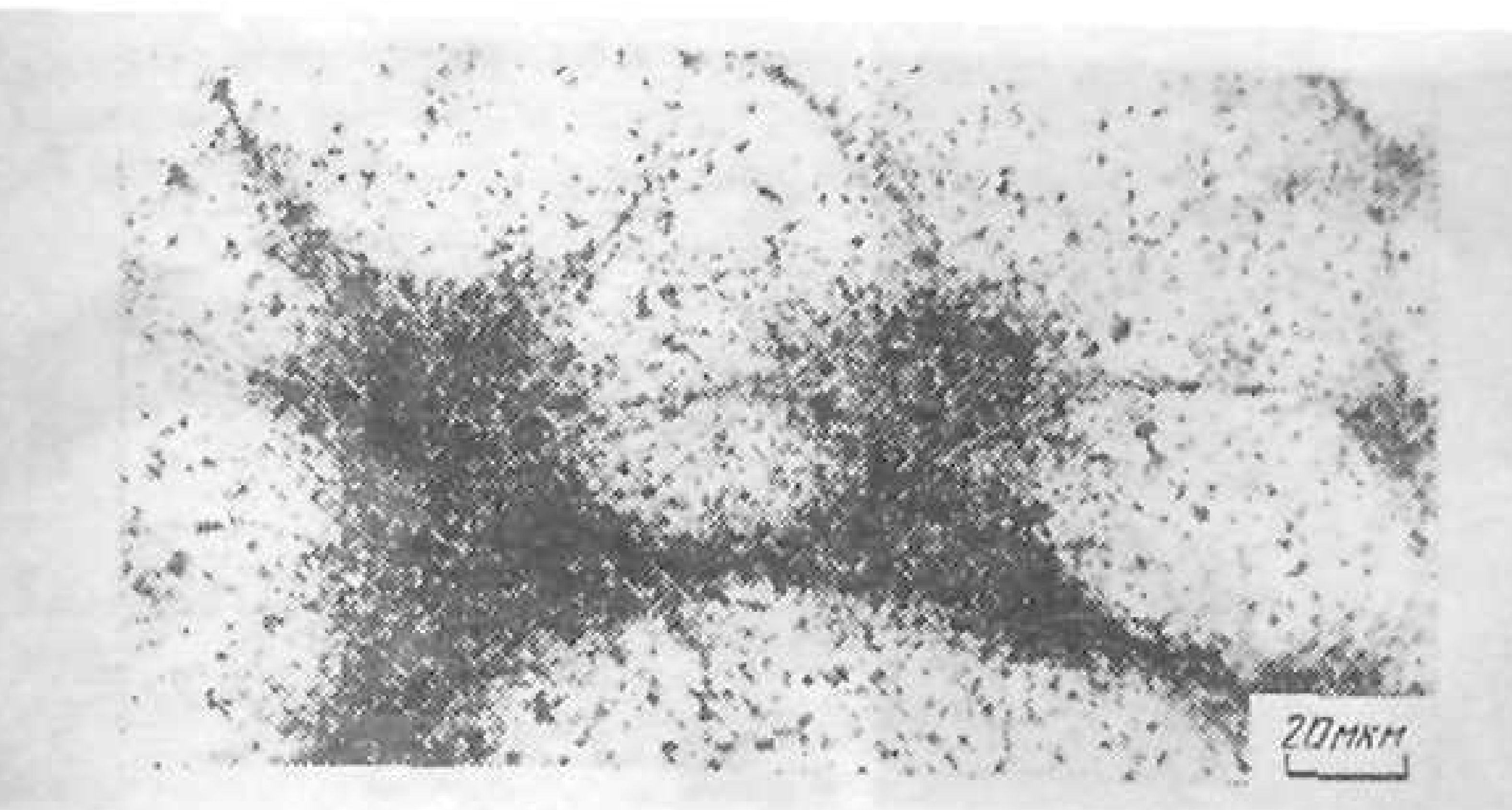


Рис. 113. Агрегаты целомоцитов морского ежа in vitro

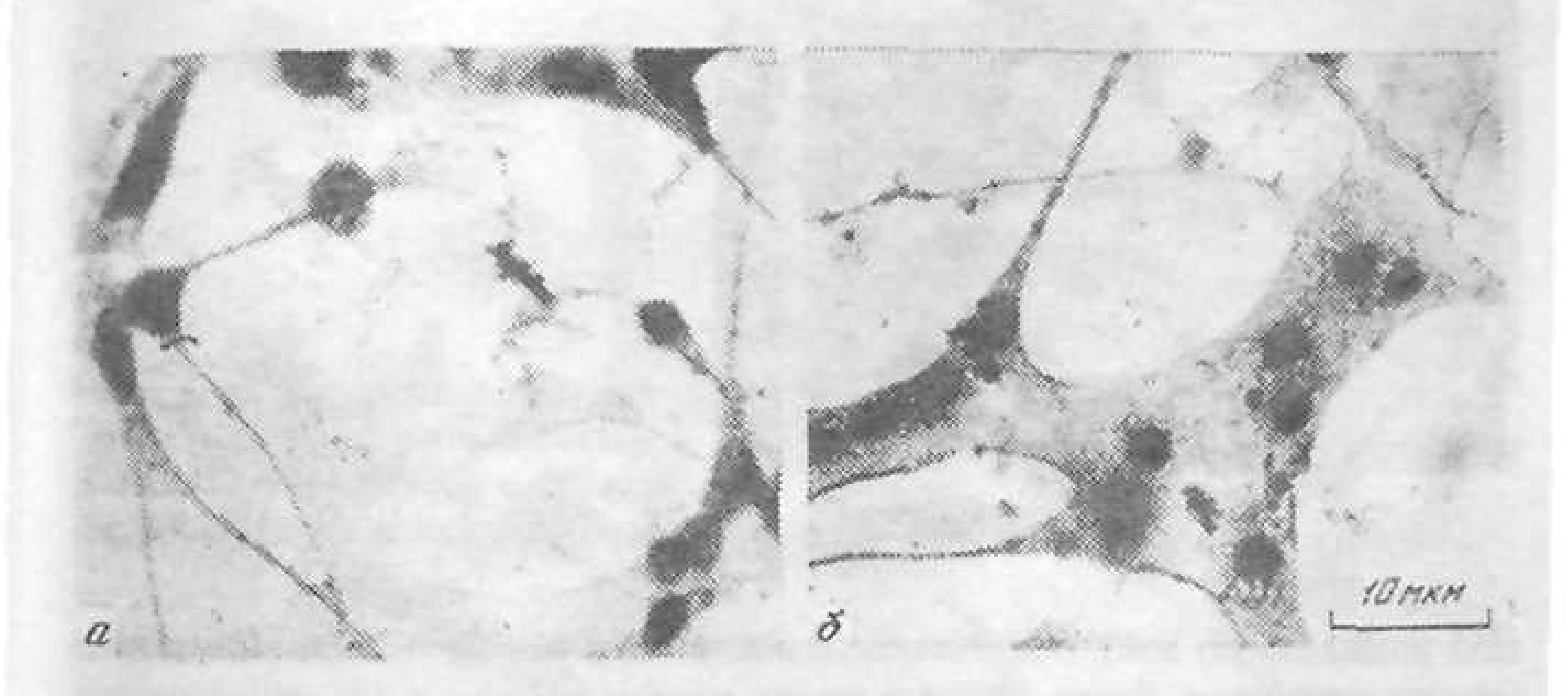


Рис. 114. Лейкоциты морского ежа в однослойной культуре
а — через 12 ч; *б* — ламеллярный синцитий (через 36 ч)

Гемоциты гребешка Mizuhopecten yessoensis (Исаева, Подгорная, 1984) после помещения в морскую воду (с сывороткой или без нее) образуют клеточные агрегаты, оседающие на дно чашки (рис. 116). В среде с 50% гомологичной сыворотки размер клеточных агрегатов увеличивается в течение нескольких часов за счет присоединения одиночных клеток и объединения мелких клеточных агрегатов гемоцитов; лишь немногие клетки распластаны по субстрату, большинство же гемоцитов, как изолированно лежащих, так и входящих в состав агрегатов, не прикреплены к субстрату и не распластаны по нему (рис. 116). Через 3–4 сут пребывания в среде с гомологичной сывороткой клеточные агрегаты постепенно распадаются с образованием слоя округлых, рыхло лежащих на субстрате клеток.

В морской воде или воде, содержащей 3% гетерологичной сыворотки, уже через 0,5 ч после помещения гемоцитов в чашки Петри заметны распластывание и миграция клеток из агрегатов. В течение нескольких часов гемоциты мигрируют из агрегатов, образуя сначала вокруг каждого агре-

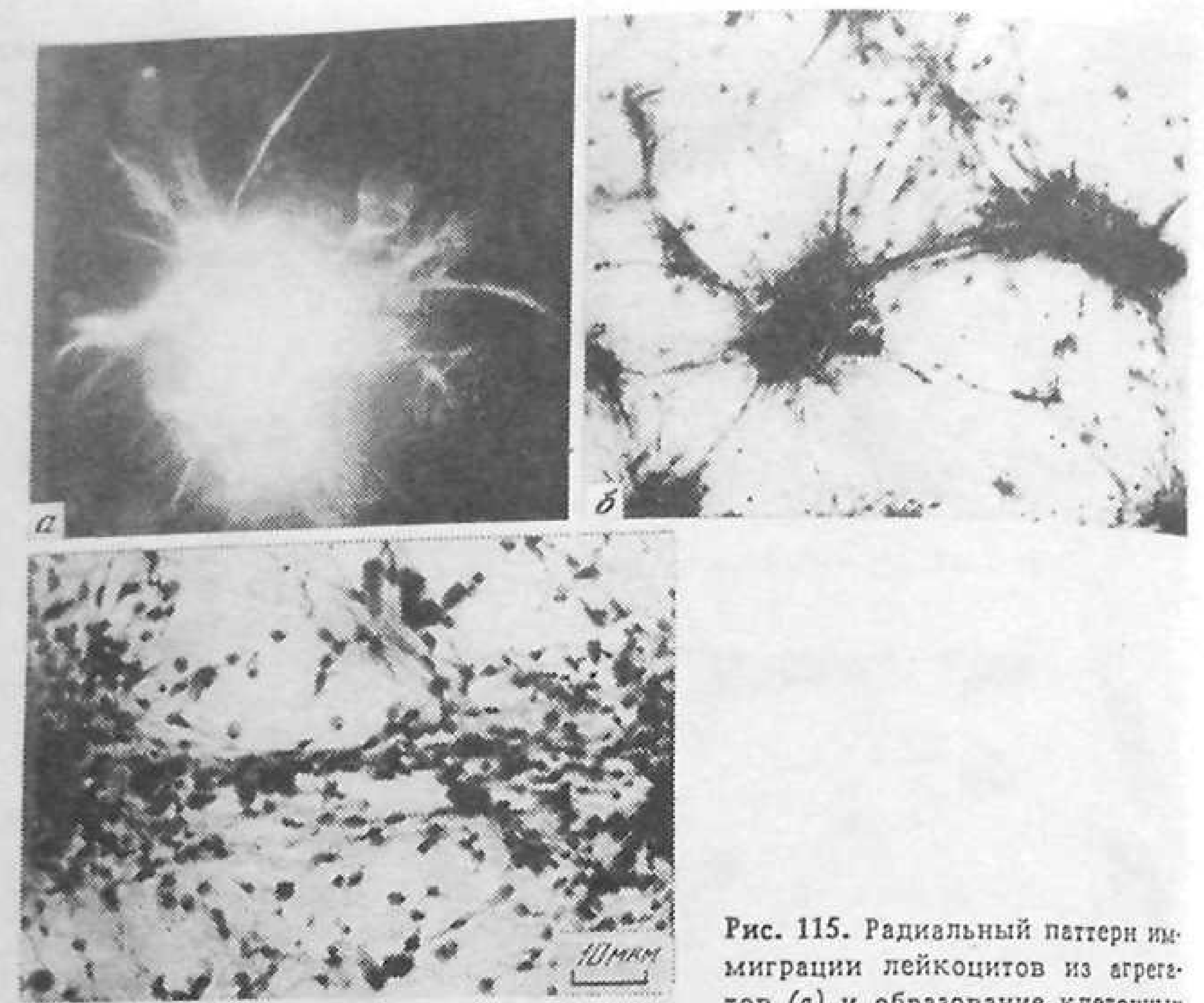


Рис. 115. Радиальный паттерн иммиграции лейкоцитов из агрегатов (а) и образование клеточных мостиков между агрегатами (б, в)

гата радиальную зону выселяющихся клеток и позже однослойную клеточную культуру. Через 12–24 ч после посева клеток в морскую воду с гетерологичной сывороткой агрегаты гемоцитов почти полностью исчезают, клетки оказываются в однослойной фазе, состоящей из контактирующих клеточными отростками распластанных, морфологически фибробластоподобных мульти- или биполярных гемоцитов (рис. 117). Псевдоподии клеток представлены ламеллоподиями, реже филоподиями. Морфологически гемоциты гребешка в однослойной культуре сходны с гранулоцитами (амебоцитами) других моллюсков.

В морской воде с 3% гетерологичной сыворотки однослойная культура подвижных фибробластоподобных клеток поддерживается при ежесуточной смене среды в течение 3–4 сут без заметной потери жизнеспособности.

Замена среды с 50% гомологичной сыворотки в течение первых 2 сут культивирования морской водой с гетерологичной сывороткой вызывает распластывание гемоцитов с переходом их в однослойную фазу подобно тому, что наблюдается в культурах гемоцитов, изначально помещенных в среду, не содержащую гомологичной сыворотки гемолимфы. Замена среды через 3 сут значительно менее эффективна, по-видимому, вследствие понижения жизнеспособности гемоцитов.

Подобное же преобладание либо агрегации клеток, либо прикрепления их к субстрату – в зависимости от добавления к среде гомологичной или

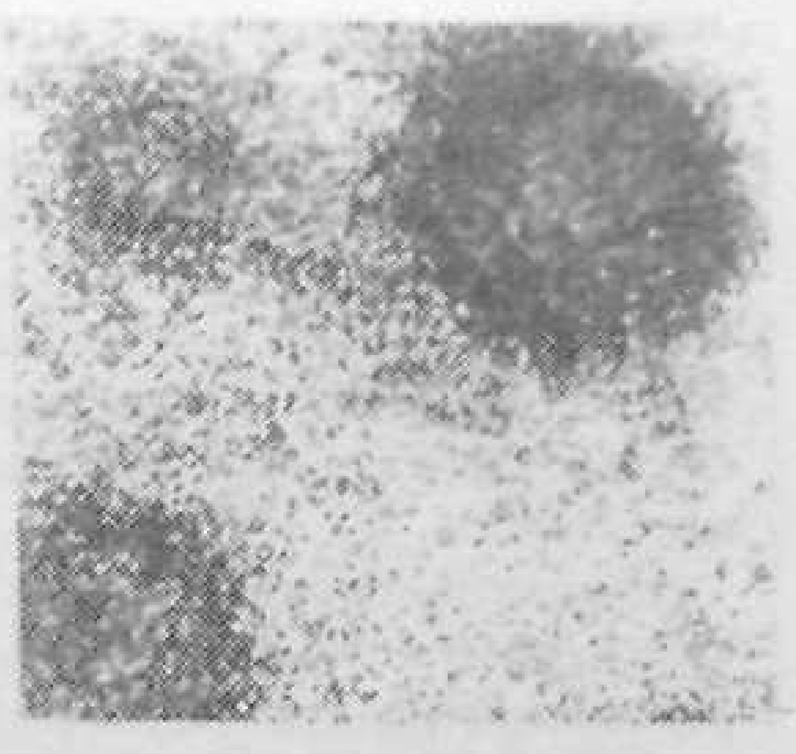


Рис. 116. Агрегация гемоцитов моллюска Mizuhopecten yessoensis в среде гомологичной сывороткой

Рис. 117. Распластывание гемоцитов M. yessoensis по субстрату в среде с гетерологичной сывороткой



гетерологичной сыворотки соответственно – наблюдалось и на пигментированных гемоцитах Anadara broughtoni.

Таким образом, целомоциты и гемоциты in vitro в условиях, способствующих прикреплению клеток к искусственному двумерному субстрату, проявляют характерную для всех клеток однослойных культур тенденцию к плоскостной контактной ориентации и созданию структурных паттернов. Плоскостная контактная ориентация ясно выражается в появлении распластанных по субстрату ламеллярных синцитиев. Картины структурирования клеточного слоя не столь разнообразны, как в дифференцирующихся культурах спикулогенных и миогенных клеток, и ограничиваются радиальными, звездчатыми паттернами миграции клеток из агрегатов с образованием клеточных тяжей между агрегатами. Линейность клеточных мостиков, соединяющих агрегаты по кратчайшему расстоянию между ними, по-видимому, определяется механическим натяжением этих клеточных тяжей и отдельных составляющих их клеток. Подобные же сетчатые паттерны возникают в однослойной культуре целомоцитов через несколько часов после посева суспензии изолирован-

ных клеток в результате агрегации и перемещения целомоцитов в однослойной фазе. Разрушение таких структурных паттернов при воздействии цитохалазином доказывает зависимость их возникновения и поддержания от функционирования системы актиновых филаментов.

Своеобразие клеток целомической и гемальной жидкостей – взвешенность их в жидкой внутренней среде организма при нормальном его состоянии. Лишь в условиях нарушения гомеостаза целомоциты и гемоциты осуществляют свои контактные реакции, сопряженные с реорганизацией цитоскелета.

Совокупность всех данных о наличии у иглокожих интегрированного клеточного и гуморального иммунитета с разнообразными защитными реакциями на клеточном и системном уровнях позволяет считать эту группу животных весьма прогрессивной в отношении эволюции иммунной системы (см.: Исаева, Коренбаум, 1989). Иглокожие обладают способностью к быстрому и эффективному заживлению ран и высокими регенеративными потенциями. В процессе первичной репарации раны целомоциты проявляют те же морфогенетические реакции, что и при свертывании и инкапсуляции: клетки, мигрировавшие в зону повреждения, распластываются, стремясь закрыть наибольшую раневую поверхность, подвергаются морфологической трансформации и агрегируют, образуя раневую пробку, изолирующую внутреннюю среду организма от внешнего окружения. Сокращение сгустка стягивает края раны, лейкоциты осуществляют фагоцитоз некротических остатков. Кроме этого, клеточные и внеклеточные элементы тромба, образовавшегося в месте повреждения, выполняют защитно-морфогенетическую функцию, создавая субстрат для миграции эпителиальных или иных клеток, обеспечивающих регенерацию поврежденной ткани (Kanungo, 1984).

Поведенческие реакции целомоцитов in vitro аналогичны тем, которые проявляются при инкапсуляции и свертывании. Обычная реакция культивируемых клеток при контакте с субстратом – распластывание, стремление занять возможно бо́льшую поверхность. Эта реакция наблюдается in vivo у целомоцитов при инкапсуляции и репарации раны и приводит к образованию монослоя in vitro и даже синцития. Морфологическая трансформация амебоцитов в филоподиальную форму, как при свертывании, способствует увеличению контактов клеток между собой, а сокращение формирующихся тяжей клеток – образованию клеточных агрегатов (Bertheussen, Seljelid, 1978).

Реакция свертывания целомической жидкости иглокожих (как и гемолимфы или крови других животных) – стереотипный ответ на контакт целомической жидкости с внешней средой, т.е. ранение организма. Неоднократно показано, что целомоциты, представленные в целомической жидкости интактных животных суспензией одиночных клеток, после выделения жидкости из организма быстро, в течение нескольких минут, образуют клеточные сгустки, агрегаты. Агрегация (агглютинация) целомоцитов иглокожих in vitro – проявление защитной гемостатической функции (Andrew, 1965; Endean, 1966; Edds, 1977; Kanungo, 1982, 1984), первый тип сгусткообразования по Булутиану и Гизе (см. выше), примитивная в эволюционном плане форма тромбообразования, типичная для большинства представителей беспозвоночных (Купер, 1980; Заварзин, 1982, 1985).

Как и у целомоцитов иглокожих, в культуре гемоцитов гребешка Mizuhopecten yessoensis (Исаева, Подгорная, 1984) и анадары *Anadara broughtoni* наблюдаются две четко различимые формы поведения гемоцитов, зависящие от состава культуральной жидкости: 1) агрегация, 2) распластывание по субстрату. Так как клетки агрегатов при изменении среды оказываются способными к распластыванию и переходу в однослойную фазу, то, очевидно, обе реакции осуществляются одними и теми же клетками.

Агрегация гемоцитов гемолимфы моллюсков – стереотипная реакция, отмеченная многими авторами, протекающая сразу же после выделения гемолимфы из организма и подавляемая при удалении сыворотки гемолимфы путем промывки морской водой или физиологическим раствором (Davies, Partridge, 1972; Foley, Cheng, 1974; Jeong, Heyneman, 1976; Reade, 1976; Renwrantz *et al., 1979; Bayne, 1981*). Агрегация (агглютинация) гемоцитов in vitro – проявление защитной, гемостатической функции (Davies, Partridge, 1972; Brewster, Niocholson, 1979), т.е. первичной формы тромбообразования, осуществляемой у большинства беспозвоночных животных (и моллюсков в том числе) как основной и конечный этап сгусткообразования.

Контакт гемолимфы in vitro с внешней средой, по-видимому, приводит к нарушению гомеостаза гемолимфы, что имитирует повреждение организма и вызывает агрегацию гемоцитов, т.е.реакцию,предотвращающую потерю гемолимфы организмом при ранении. Так как в гемолимфе интактного животного и in vitro в отсутствие сыворотки гемолимфы агрегация гемоцитов подавлена, можно предположить, что агглютинация клеток крови опосредована какими-то факторами гемолимфы, активируемыми при изменении ее гомеостаза. Действительно, в выделенной из организма гемолимфе моллюсков найдены гемагглютинины эритроцитов и собственных гемоцитов (Stein, Basch, 1979; Купер, 1980).

В отсутствие агглютинирующегося фактора гемолимфы активация гемоцитов in vitro проявляется в иной, также стереотипной и неоднократно описанной форме – псевдоподиальной активности, обусловливающей прикрепление к субстрату, распластывание и передвижение (Davies, Partridge, 1972; Foley, Cheng, 1974; Partridge, Davies, 1974; Jeong, Heyneman, 1976; Reade, Reade, 1976; Renwrantz et al., 1979). Морфологически фазы прикрепления, распластывания и поляризации гемоцитов (Partridge, Davies, 1974; Jeong, Heyneman, 1976) весьма сходны в теми же реакциями, хорошо изученными на фибробластоподобных клетках позвоночных животных (Ровенский, 1979; Васильев, Гельфанд, 1981), и представляют собой типичную реакцию контактной активации, быстрой морфологической трансформации в ответ на контакт с искусственным твердым субстратом, которая в высокой степени свойственна тромбоцитам, пластинкам крови и макрофагам позвоночных животных (Ровенский, 1979; Debus et al., 1981; Leven, Nachmias, 1984).

При распластывании in vitro гемоцитов гребешка Mizuhopecten yessoensis *перестраивается организация микротрубочек* и актиновых филамен-

тов, возникают кольцевые *ламеллы и микрошипики* (*microspikes*), подобные филоподиям (Korenbaum et al., 1990). Такая контактно-зависимая реорганизация морфологии клетки и структур цитоскелета в основных чертах сходна с описанной *на целомоцитах морского ежа и клетках* позвоночных животных. Реакция морфологической трансформации с перестройкой цитоскелета при контакте с субстратом найдена у гемоцитов (выполняющих *функцию тромбоцитов*) омара (*Cohen et al., 1983*). Контактно-зависимая интегральная реорганизация клеточной и субклеточной архитектоники свойственна всем соматическим клеткам животных (см. гл. *VI*).

В отличие от такой, обратимой, как правило, клеточной контактной реакции у некоторых типов целомоцитов иглокожих и, возможно, гемоцитов *моллюсков наблюдаются и необратимые, подобные или идентич*ные цитодифференциации изменения. Наиболее ясно эти изменения выражены при трансформации моноцилиарных целомоцитов в амебоциты и *слиянии целомоцитов* (*лейкоциты*) в синцитии.

Распластывание целомоцитов и гемоцитов по субстрату in vitro обычно не рассматривалось как проявление защитной функции клеток; лишь *Брюстер и Николсон* (*Brewster, Nicholson, 1989*) *трактовали эту реакцию* гемоцитов на чуждое окружение как близкую к реакции инкапсуляции инородного тела. Прикрепление и распластывание in vitro фибробластопо*добных и макрофагоподобных клеток позвоночных сходно некоторыми* и, вероятно, неслучайными чертами с фагоцитарной реакцией и может интерпретироваться как попытка фагоцировать слишком крупное ино*родное тело* (*Wagner, Hy nes, 1982*). *Целесообразный итог такой реакции* в организме – инкапсуляция инородного тела, удаление которого путем фагоцитоза невозможно; реакция инкапсуляции может рассматриваться как *защитно-морфогенетическая. Реально у моллюсков* (*см.: Заварзин,* 1953; Sminia et al., 1974; Купер, 1980; Bayne, 1981; Заварзин, 1982; Poder et al., 1982; Fisher, 1986; Suzuki et al., 1991) и иглокожих (см.: Smith, 1981; De Ridder, *Jangoux, 1984; Jangoux, 1987; Canicatti, 1992*), *как и у других* беспозвоночных, наблюдаются и фагоцитарная реакция, и инкапсуляция инородного тела, осуществляемые одними и теми же клетками у моллюсков, тогда как у *иглокожих целомоциты* более *специализированы:* фагоцитируют лейкоциты, а в инкапсуляции принимают участие и лейкоциты, и морулярные клетки.

Итак, и агрегацию, и распластывание целомоцитов и *гемоцитов* по субстрату можно рассматривать как контактную активацию с преобладанием контактов клетка–клетка или клетка–субстрат и проявление in vitro защитных клеточных реакций *в условиях, имитирующих повреждение* организма: клеточная агрегация in vitro – аналог тромбообразования in vivo,распластывание клеток по субстрату in vitro – аналог инкапсуляции и фагоцитарной реакции in vivo.

Глава VI

ПРОСТРАНСТВЕННО-ВРЕМЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ МОРФОГЕНЕЗА: ВОЗНИКНОВЕНИЕ, ПРЕЕМСТВЕННОСТЬ И СМЕНА КЛЕТОЧНЫХ И НАДКЛЕТОЧНЫХ ПАТТЕРНОВ

Элементарные морфогенетические процессы на клеточном уровне (Васильев, Гельфанд, 1977, 1981; Vasiliev, Gelfand, 1977, 1982; Vasiliev, 1982, 1987; Kirscher, Schulze, 1986) – ключевые события в морфогенезе надклеточных систем in vivo и in vitro (Abercrombie, 1977; Trinkaus, 1984; Lackie, 1986).

У эукариотических клеток пути передачи позиционной информации от окружающей клеточной и внеклеточной среды разнообразны и не укладываются в единую простую схему. Тем не менее можно попытаться выделить и рассмотреть как отдельные звенья, фрагменты морфогенетических процессов, интегральную реакцию поляризации клетки и варианты контактных клеточных реакций, надклеточную интеграцию в мезенхимных и эпителиальных ансамблях, а также эпигенетическую память клеток и их систем как преемственность паттернов пространственной организации.

ИНТЕГРАЛЬНАЯ РЕАКЦИЯ ПОЛЯРИЗАЦИИ КЛЕТКИ

Различные проявления поляризации клеток, неизменно вовлекаемые в процессы прикрепления, распластывания и направленного движения, хемотаксиса, фагоцитоза либо обусловленные контактом клетка–клетка, можно определить как стереотипную клеточную интегральную реакцию морфофункциональной поляризации комплекса плазматическая мембрана–цитоскелет, опосредованную связыванием лигандных молекул с рецепторами плазматической мембраны (Исаева, *Преснов, 1987,* 1990а). Интегральная реакция поляризации клетки вовлекает асимметризацию распределения белков цитоскелета, мембранных компонентов, клеточных органоидов, т.е. *морфофункциональную векторизацию всей* клеточной архитектоники. Контакт клетки с искусственным субстратом in vitro вызывает перестройки комплекса плазматическая мембрана–цитоскелет, зависящие от *связывания рецепторов клеточной поверх*ности с адсорбированными на субстрате лигандными молекулами и приводящие к поляризованному (относительно поверхности субстрата), *анизотропному распределению рецепторов клеточной* поверхности и элементов цитоскелета (Васильев, Гельфанд, 1977, 1981; Vasiliev, Gelfand, 1982; Jockusch et al., 1983; Hormia et al., 1985); у клетки появляется "дорсовентральная" *полярность* (*Васильев, Гельфанд,* 1977; Mason, Jacobson, 1985), т.е. морфофункциональные различия контактной и свободной

поверхностей клетки. Контакт с субстратом индуцирует сборку элементов цитоскелета; координированность пространственной организации клеточной поверхности и цитоскелетных структур обеспечивается трансмембранными связями комплексов лиганд–рецептор с цитоскелетом через "заякоривающие" белки (винкулин и другие) в фокальных контактах клетка–субстрат (Geiger, 1982; Burridge, 1986); разнообразные лигандные молекулы, входящие в состав внеклеточного матрикса *in vivo* либо адсорбированные на субстрате in vitro, и прежде всего фибронектин, связываются с рецепторами суперсемейства интегринов (Burridge, 1986; Hynes, 1987, 1990).

Поляризация, асимметризация комплекса плазматическая мембрана–цитоскелет сопровождают связывание рецепторов клеточной поверхности с внеклеточными лигандами в процессах кеппинга (Bourguignon, Bourguignon, 1984; Turner et al., 1988), фагоцитоза (Sheterline et al., 1984), хемотаксиса (Kataoka, Tavassoli, 1984), направленного клеточного движения (Vasiliev, Gelfand, 1977; Vasiliev, 1982; Jockusch et al., 1983; Jacobson et al., 1984; Hormia et al., 1985; Ishihara et al., 1988; Bornens et al., 1989; Fukui et al., 1991; Yürüker, Niggli, 1992). Общность такой реорганизации в основных морфогенетических клеточных реакциях уже не раз подчеркивалась (Vasiliev, Gelfand, 1977, 1982; Oliver, Berlin, 1982, 1983; Oliver et al., 1983). При направленном движении клеток наблюдается упорядоченное линейное расположение клеточных органоидов – центриоли, аппарата Гольджи – относительно ядра (см.: Singer, Kupfer, 1986). Направленно движущаяся амеба Chaos chaos генерирует электрическое поле, паттерн линий которого соответствует ориентации движения (Nuccitelli et al., 1977). У стабильно поляризованных клеток эпителиальных пластов асимметризация комплекса плазматическая мембрана–цитоскелет проявляется и в асимметричном распределении ионных насосов и ионных каналов мембраны и потому в генерации электрического поля (см.: Almers, Stirling, 1984), и в векторизации внутриклеточного транспорта, ионного и мембранного (см.: Hopkins, 1991). Поэтому поляризация клетки представляет собой кооперативную смену состояния, фазовый переход (Белинцев, 1991), интегральную клеточную реакцию.

Подобная интегральная реакция поляризации проявляется и как отклик на контакт клетка–клетка. Диссоциированные клетки эмбрионов в модельных системах in vitro реагируют на контакт друг с другом поляризацией распределения компонентов мембранно-цитоскелетного комплекса и интегральной поляризацией всей цитоархитектоники (см. ниже). Однотипное кольцевидное распределение актина, миозина, спектрина и калмодулина найдено у бластомеров мышиного эмбриона и в областях контактов клетка–клетка, и у контактной поверхности клетка–субстрат (Sobel, 1984; Sobel et al., 1988). Взаимный кеппинг и взаимный ко-кеппинг, обусловленный связыванием рецепторов поверхности (одновременно служащих лигандами и представленных молекулами клеточной адгезии – CAM) двух контактирующих клеток (Singer, 1992), в ходе развития может детерминировать судьбу обеих клеток, например иммунокомпетентных (см.: Singer,1992).

Итак, связывание рецепторов клеточной поверхности с лигандными молекулами, свободно диффундирующими в среде (кеппинг, хемотаксис), локализованными на поверхности другой клетки (контакт клетка–клетка), *фиксированными на* поверхности искусственного субстрата (контакт клетка–субстрат), пищевой частицы (фагоцитоз) или иного чужеродного тела (инкапсуляция, распластывание) вызывает стереотипную интегральную клеточную реакцию, ведущую к анизотропному, поляризованному распределению элементов системы плазматическая мембрана–цитоскелет (рис. 118).

Локализация контактного либо иного воздействия дает позиционную информацию, определяющую ориентацию оси поляризованной клетки. Сама же реакция поляризации – стереотипный, неспецифический ответ клетки на самые разнообразные воздействия, в том числе и нелокализованные. К примеру реакция поляризации, проявляющаяся в асимметричном распределении актина и тубулина, наблюдается и при обработке клеток экзогенными жирными кислотами (Karnovsky et al., 1982) или лектинами (кеппинг).

Интегральная поляризация клетки, индуцируемая локальным контактом с другой клеткой, внеклеточным веществом или искусственным субстратом, может быть названа контактной поляризацией, если использовать в более широком смысле удачный термин Л.В. Белоусова (1987б; Белинцев и др., 1985), понимая под этим контактно-зависимые проявления интегральной поляризации клеток, необязательно связанные с удлинением клетки как внешним морфологическим проявлением поляризации.

Контактные реакции клетка–клетка и клетка–субстрат наиболее ясно выражены в модельных системах in vitro и исследованы нами в спикулогенной, миогенной культурах и выделенных из организмов животных целомоцитах и гемоцитах. Защитные функции целомоцитов и гемоцитов in vivo проявляются в реакциях фагоцитоза и инкапсуляции инородного тела, тромбообразования и первичной репарации раны (рис. 119). In vitro защитно-морфогенетические функции этих клеток "быстрого реагирования" модулируются, проявляясь в виде двух основных стереотипных клеточных реакций (рис. 119) – агрегации (аналог тромбообразования in vivo) и распластывания по искусственному субстрату (аналог инкапсуляции и фагоцитоза).

В процессе первичной репарации раны целомоциты проявляют те же морфогенетические реакции, что и при свертывании и инкапсуляции: клетки, мигрировавшие в зону повреждения, распластываются, стремясь закрыть наибольшую раневую поверхность, подвергаются морфологической трансформации и агрегируют, образуя раневую пробку, изолирующую внутреннюю среду организма от внешнего окружения. Кроме этого, целомоциты тромба, образовавшегося в месте повреждения, выполняют защитно-морфогенетическую функцию, создавая субстрат для миграции эпителиальных или иных клеток, обеспечивающих регенерацию поврежденной ткани.

Все перечисленные случаи можно рассматривать как варианты единой реакции активации. Это интегральная клеточная реакция, которая лишь

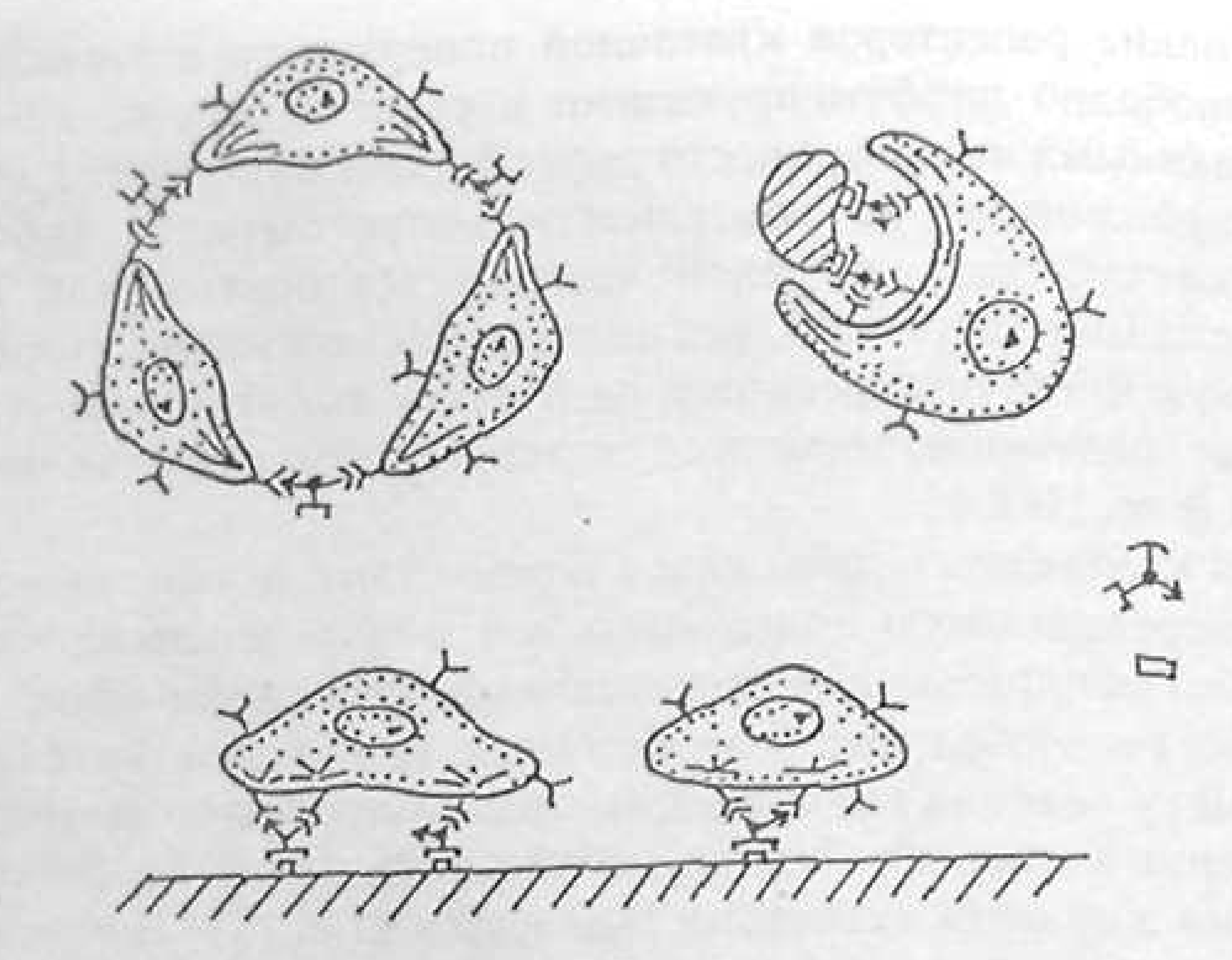


Рис. 118. Схема интегральной реакции поляризации клетки

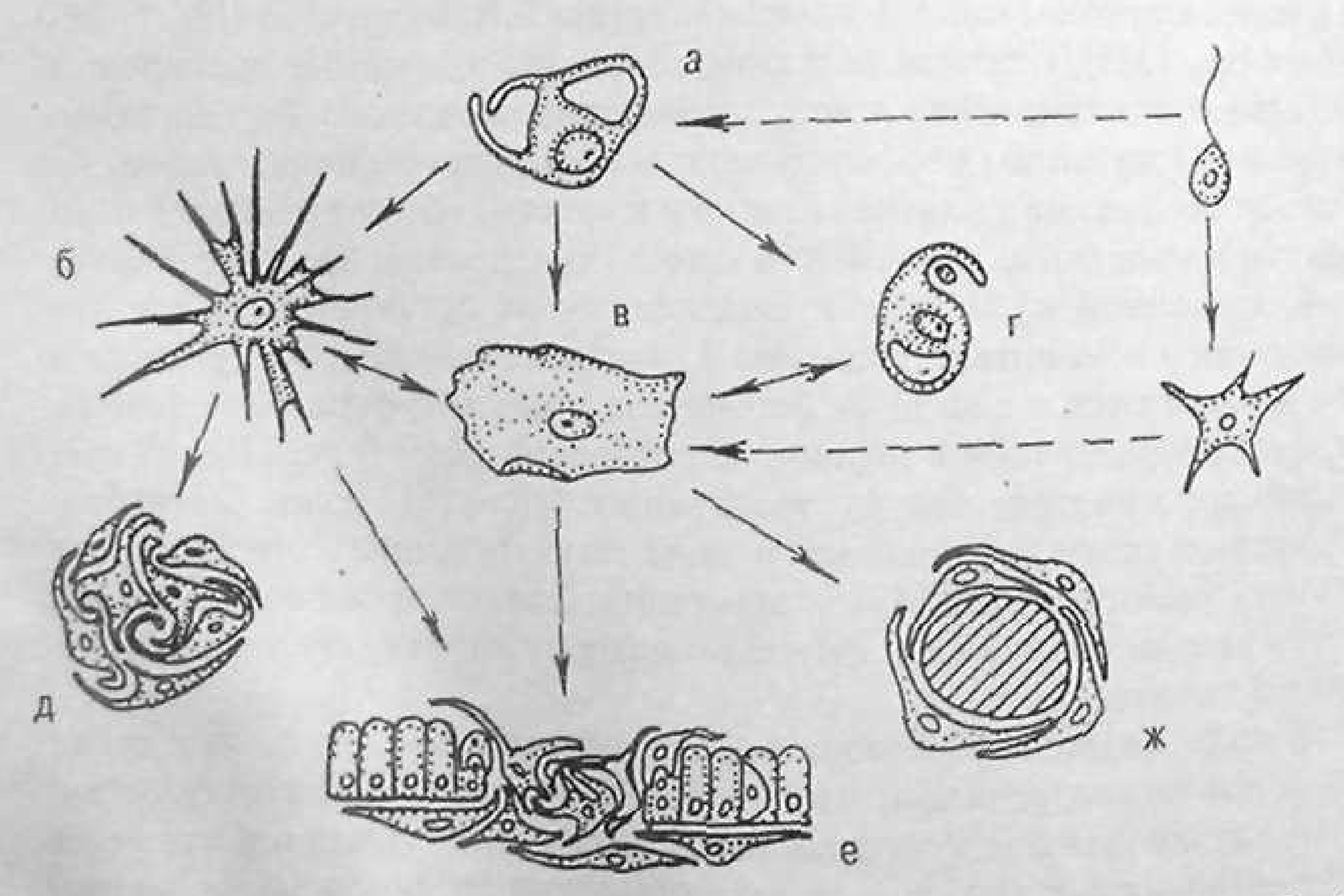


Рис. 119. Схема защитно-морфогенетических реакций амебоцитов (Исаева, Коренбаум, 1989)

а — исходное состояние до активации; *б* — филоподиальная трансформация; *в* — ламеллярная трансформация (распластывание); *г* — фагоцитоз; *д* — агрегация; *е* — первичная репарация раны; *ж* — инкапсуляция инородного тела

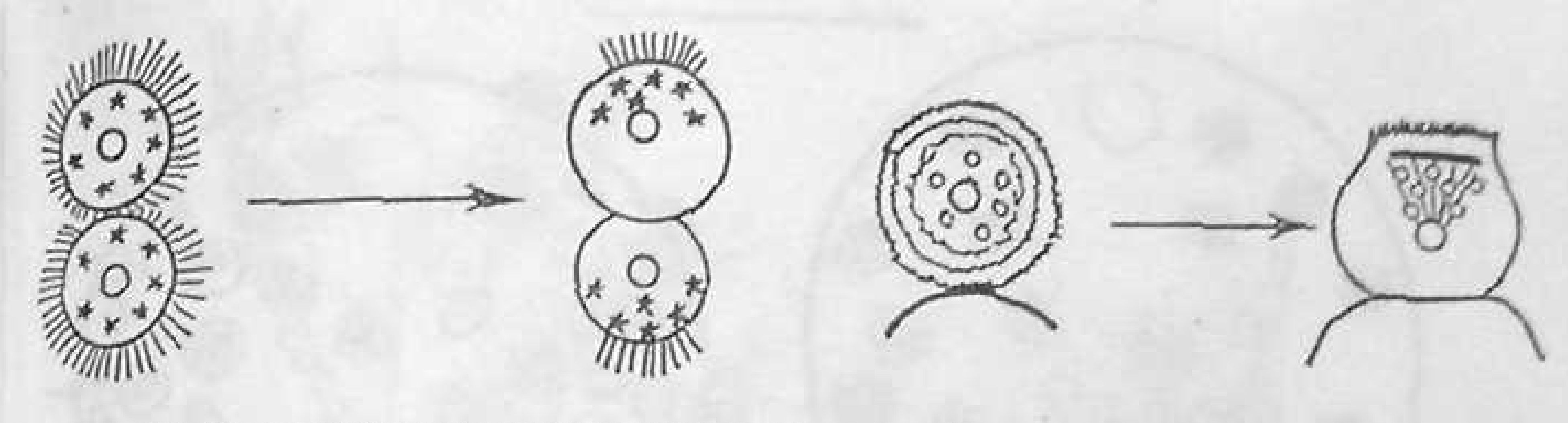


Рис. 120. Схема контактно зависимой поляризации бластомеров (Johnson, Maro, 1985)

при *морфологической трансформации* взвешенных клеток не связана с их поляризацией, тогда как во всех случаях контактных реакций клетки с другой *клеткой или инородным телом* (т.е. реакцией на анизотропию среды) осуществляется контактно-зависимая поляризация клетки. Контактно-зависимая *поляризация* (морфофункциональная трансформация) клеток, в том числе исследованных нами гемоцитов и целомоцитов, определяется реорганизацией цитоскелета, в частности сборкой комплексов актиновых филаментов, и подавляется цитохалазином, как это показано на лейкоцитах морского ежа (Edds, *1980*), гемоцитах моллюска Patella (Jones, Partridge, 1974) и нами на морулярных, моноцилиарных целомоцитах и лейкоцитах морского ежа.

В ходе эмбрионального развития контактная зависимость морфогенеза проявляется уже в раннем дроблении: дробление яйца ведет к возникновению системы бластомеров, контактные взаимодействия которых вызывают неизбежное усложнение этой системы. Контактно-зависимая поляризация бластомеров у зародыша мыши осуществляется на 8-бластомерной стадии развития как интегральная клеточная реакция поляризации (рис. 120). Она проявляется в стягивании микроворсинок на апикальном полюсе бластомеров, перераспределении мембранных рецепторов, липидных компонентов мембраны, клеточных органоидов, концентрации миозина, актина, спектрина в областях межбластомерных контактов (см. гл. II). Поляризация бластомеров, как и поляризация других клеток, зависит от функционирования актиновых филаментов и микротрубочек; поддержание же поляризованного состояния сопряжено с резистентностью к ингибиторам цитоскелета (Johnson, Maro, *1985*; Fleming *et al.*, 1986a, b).

Поляризованные бластомеры мыши генерируют внеклеточное *электрическое* поле с паттерном силовых линий, ориентированным по апикально-базальной оси бластомера (Nuccitelli, Wylie, 1985). Контакт двух *изолированных* бластомеров ведет к взаимному ко-кеппингу рецепторов клеточной поверхности, асимметризации обоих бластомеров и, *таким образом*, контактно-зависимому превращению двух исходно неполяризованных клеток в интегрированную систему, образуемую *минимальным числом* клеток — двумя. Мембранно-цитоскелетный комплекс служит посредником и движущей силой интеграции надклеточной *архитектоники*. Как и при других проявлениях контактно-зависимой реакции поляризации, граничные условия дают позиционную информацию, детерминирующую

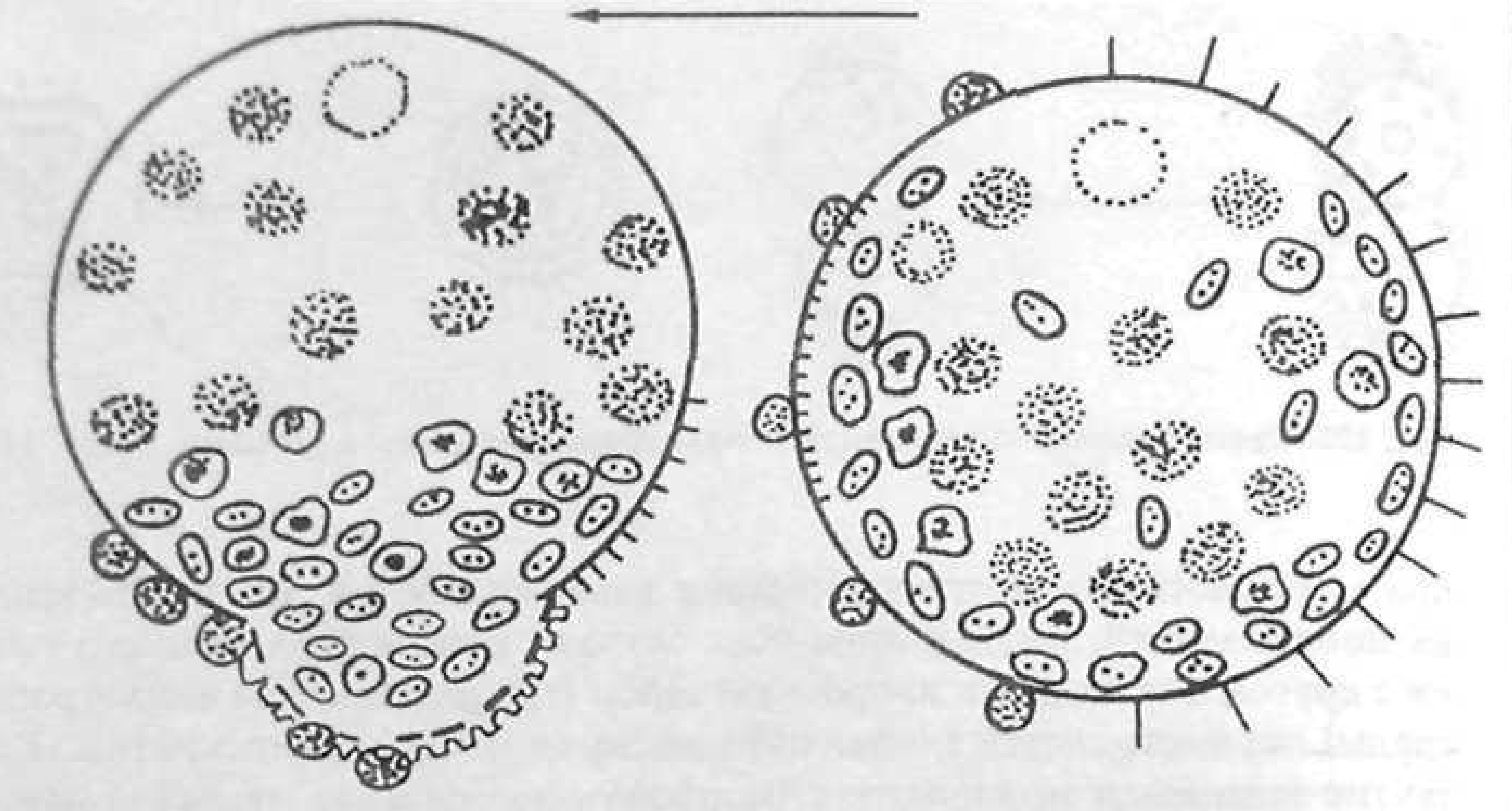


Рис. 121. Схема ооплазматической сегрегации у асцидии (Sawada, 1983)

направление оси поляризации, сама же интегральная реакция поляризации в значительной мере автономна. Ее неизбежность – следствие *неустойчивости аполярного состояния клетки.*

Процесс ооплазматической сегрегации вслед за оплодотворением, усиливающий предшествующую анимально-вегетативную полярность яйца, сходен с кеппингом соматических клеток (что впервые отмечено Залокаром – Zalokar, 1980) и другими проявлениями поляризации клеток и может рассматриваться как подобная перестройка комплекса плазматическая мембрана–цитоскелет (Преснов, Исаева, 1985; Исаева, Преснов, 1987, 1990а).

Исследование поляризации яиц различных организмов привели к заключению, что анизотропия распределения фибриллярного актина в яйце – результат направленного сокращения кортикальной цитоскелетной оси с сопутствующим пассивным перемещением всех связанных этой сетью мембранных органоидов и РНК, что приводит в итоге к поляризации их распределения, как и распределения микроворсинок и рецепторов поверхности *(рис. 121; см. гл. I). Кооперативный* характер реорганизации цитоархитектоники яйцевых клеток свидетельствует о том, что поляризация яйца – интегральная клеточная реакция, подобная поляризации соматических клеток, и движущая сила ее – опорно-сократительная система ооплазмы. Морфогенетическое значение поляризации цитоскелета яйца более существенно и универсально, чем определение судьбы отдельных зачатков: морфофункциональная поляризованность цитоскелета яйца и всей ооплазмы детерминирует осевую анизотропию будущего морфогенеза.

Есть теоретические основания полагать, что поляризация яйца неизбежна и эндогенно обусловлена (Преснов, Исаева, 1985), однако ориентация оси направляется анизотропией окружения. Известно, что ориентация анимально-вегетативной оси яйца животных определяется локализа-

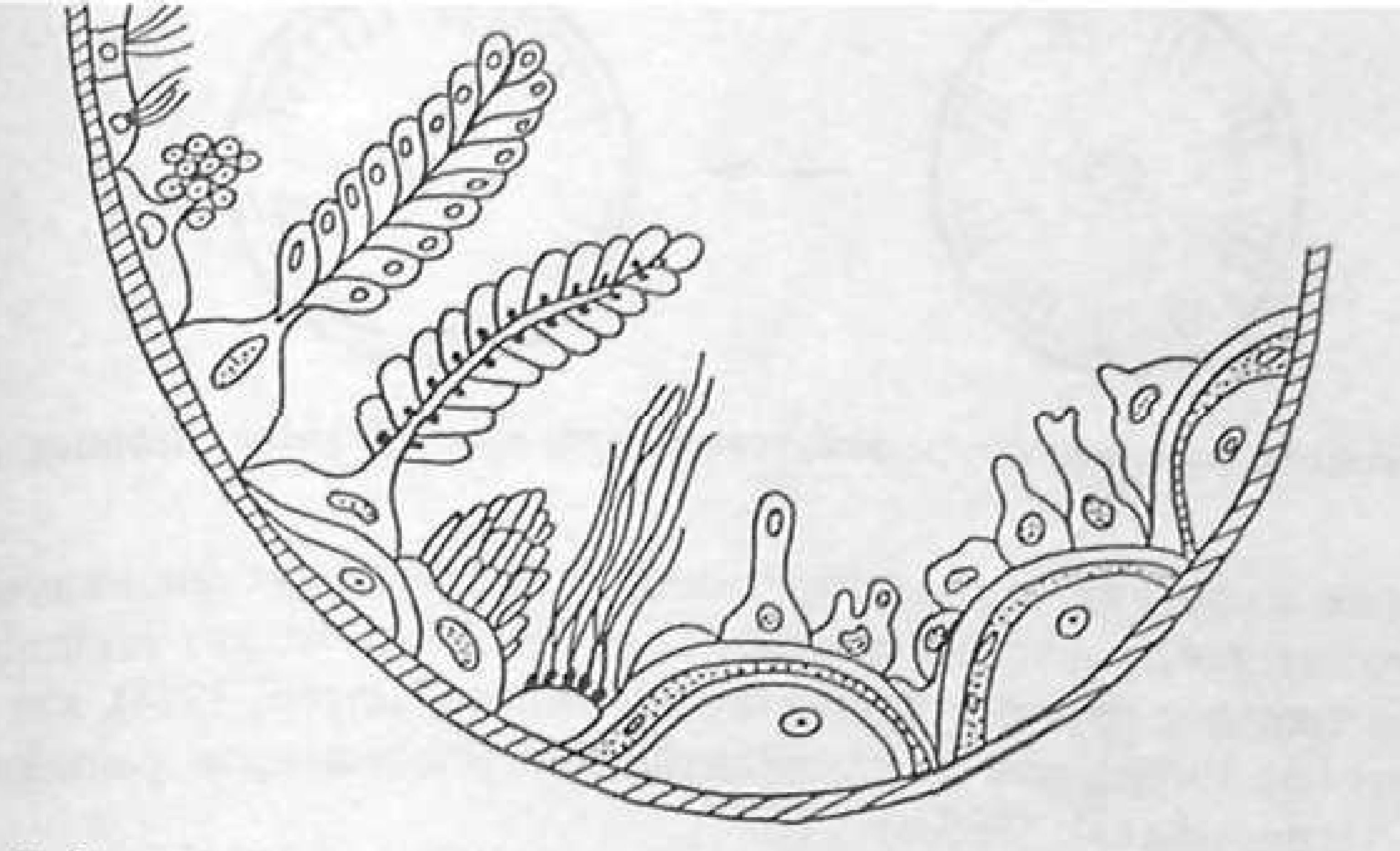


Рис. 122. Схема контактов половых клеток с клеточным и внеклеточным окружением в гонаде моллюска (Schroeder, Talbot, 1985)

цией прикрепления ооцита к стенке гонады (рис. 122) и, возможно, еще раньше положением оогониальных клеток в гонаде, т.е. контактом будущей яйцевой клетки с внеклеточным матриксом; позже в некоторых случаях (у моллюсков, насекомых) прослежены влияния окружающих ооцит клеток соматической или половой линии на проморфологию яйца. Направление поляризации другой высокополяризованной гаметы – спермия – подобным образом зависит от ориентации клеток сперматогенного ряда относительно клеточных элементов гонады.

Ооплазматическую сегрегацию индуцирует в норме контакт яйца со спермием, опосредованный, как и все клеточные взаимодействия, специфическими рецепторами поверхности гамет. Ооплазматическая сегрегация усиливает предшествовавшую анимально-вегетативную полярность яйца; у хордовых животных контакт яйца со спермием индуцирует дополнительную асимметризацию комплекса мембрана–цитоскелет, что проявляется, в частности, концентрацией актина в месте вхождения спермия мыши (см.: Maro et al., 1986) и поляризованным по дорсовентральной оси сокращением кортикального слоя яиц, индуцируемым *микротрубочками спермастера, у амфибий и асцидий (см. гл.* I). Вероятно, ооплазматическая сегрегация, как и поляризация бластомеров, как и все процессы контактной поляризации соматических и половых клеток, осуществляется функционированием сократительного актомиозинового комплекса и направляется системой микротрубочек. Локальное устойчивое изменение системы актиновых филаментов, вероятно, влияет на ориентацию системы микротрубочек, в свою очередь направляющей внутриклеточный транспорт, что ведет к поддержанию и усилению поляризации зиготы (рис. 123; Brawley, Robinson, 1985). Асимметризация яйца вслед за контактом и слиянием со спермием тоже частный случай контактно-зависимой реакции клеточной поляризации, при которой локализация точки контакта гамет дает позиционную информацию, детерминирующую у некоторых билатеральных животных положение дорсовентральной оси.

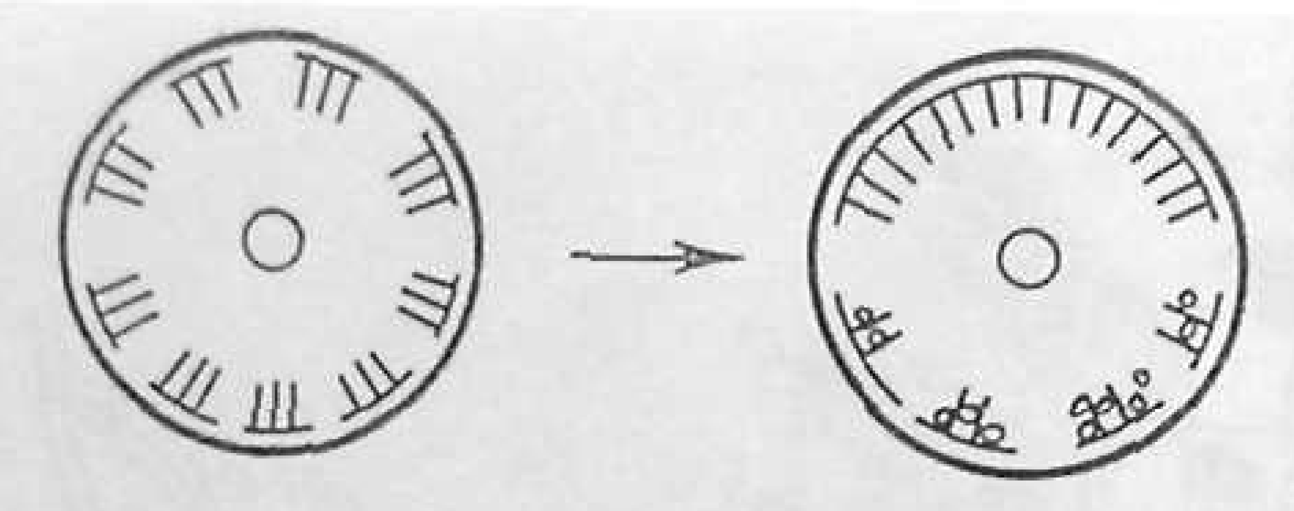


Рис. 123. Схема поляризации зиготы фукусовых водорослей (Brawley, Robinson, 1985)

У других животных дорсовентральная полярность устанавливается иным образом: так, у моллюсков ориентация этой оси может зависеть от контактов ооцита с другими клетками в яичнике (Raven, 1964), как и у дрозофилы (см. ниже), или от взаимодействий бластомеров раннего зародыша (*Martindale et al., 1985 и гл. II*).

Следовательно, важнейшие события, связанные с поляризацией клеток в гаметогенезе, при оплодотворении и в ходе раннего развития, детерминируются контактами клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс. Контактно-зависимая интегральная реакция поляризации клетки – основа морфогенетических процессов, первичный морфогенетический акт на клеточном и надклеточном уровнях.

ФИЗИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ В МОРФОГЕНЕЗЕ: КОНТАКТНАЯ ОРИЕНТАЦИЯ КЛЕТОК И ОТКЛИК НА МЕХАНИЧЕСКИЙ СТРЕСС

Понятие контактного направления движения клеток, контактной ориентации их было введено Вейсом (Weiss, 1947, 1961). С тех пор проведено немало исследований контактной ориентации и контактного направления движения клеток вдоль каких-либо линейных ориентиров субстрата in vivo или in vitro (*см.: Trinkaus, 1984; Lackie, 1986, а также гл. 4*). Такого рода контактную ориентацию следует назвать линейной, в отличие от контактной ориентации клеток на плоском субстрате, тем самым различая линейную и плоскостную контактную ориентацию (рис. 124); в *однослойной клеточной культуре линейная контактная* ориентация всегда сочетается с плоскостной, определяемой двумерностью поверхности прикрепления и перемещения клеток. Плоскостная контактная ориентация – обычное, типичное для однослойных культур клеток проявление адгезии к искусственному субстрату in vitro и распластывания по нему, именно потому не привлекшее особого внимания. Лишь при исследовании морфогенетических паттернов в дифференцирующихся клеточных культурах, сравнении паттернов in vivo и in vitro, в однослойной и суспензионной культурах становится ясным своеобразие планарных морфогенезов в монослое.

Обычное проявление плоскостной контактной ориентации на клеточном уровне – образование ламеллоподий, распластывание клетки и при-

а

б

Рис. 124. Схема пространственной организации миотуб

а – на субстрате с ровной поверхностью; *б* – на субстрате с параллельными бороздками поверхности

обретение морфофункциональных различий контактирующей с субстратом и обращенной в жидкую среду поверхностей клетки (см. выше). Эти различия возникают в результате реакции клетки на физико-химическую анизотропию окружения и подобны различиям апикальной и базальной поверхностей эпителиальных клеток.

В однослойной клеточной культуре поверхность субстрата (граничные условия) задает двумерность морфогенезов. Клеточные слои in vitro не полностью самособираемы, и для структурообразования в них необходима искусственная твердая поверхность (Steinberg, 1970). Плоскость этой поверхности ориентирует организацию элементов цитоскелета, распластывание клеток и структурообразование в клеточном слое, т.е. контактно-зависимые плоскостные морфогенезы.

Разумеется, прикрепление и перемещение клеток in vivo и in vitro – сложные биологические события, вовлекающие реорганизацию мембранно-цитоскелетного комплекса и опосредованные связыванием специфических рецепторов клеточной поверхности с лигандными молекулами внеклеточного матрикса, адсорбируемыми на искусственном субстрате in vitro (см. выше). Однако физическая структура и само наличие или отсутствие ригидного субстрата накладывают существенные ограничения на морфогенетические возможности клеток.

Физико-химическая структура поверхности контролирует прикрепление и передвижение клеток in vitro, определяет их форму и направление миграции. Контактная ориентация и контактное направление движения клеток наблюдалось вдоль бороздок субстрата – естественного или искусственного происхождения, стеклянных нитей, тяжей фибрина, фибрилл коллагена, молекул фибронектина и т.д. (см. гл. IV). В миогенной культуре на субстратах с параллельной исчерченностью поверхности миобласты, миосимпласты и зрелые миотубы ориентируются вдоль бороздок субстрата, располагаясь параллельно друг другу (см. рис. 124). На тех же субстратах с равной поверхностью миотубы оказываются различным образом ориентированы, ветвятся и анастомозируют. В спикулогенной однослойной культуре плоскость субстрата определяет ориентацию развивающихся in vitro скелетных спикул. В гл. IV приведен пример чисто контактной, без химических морфогенов, передачи влияния граничных условий, что создает упорядоченность в клеточной системе: локальные контактные взаимодействия клетка–субстрат ведут к ориентации биполярных клеток (миобластов) вдоль края подложки, локальные контактные взаимодействия клетка–клетка поддерживают и передают эту упорядоченность. Дугообразная форма миотуб, вписанных в прямой угол стеклянной подложки, – результат физических ограничений, задающих контактную линейную ориентацию клеток и симпластов вдоль края субстрата, и биологических ограничений, не позволяющих миотубам сгибаться под прямым углом. При кольцевом расположении коллагеновых фибрилл удается получить соответствующий кольцевой или спиральный паттерн миосимпластов (Turner, 1986).

В двумерном пространстве однослойной клеточной культуры при отсутствии каких-либо линейных ориентирующих влияний субстрата,

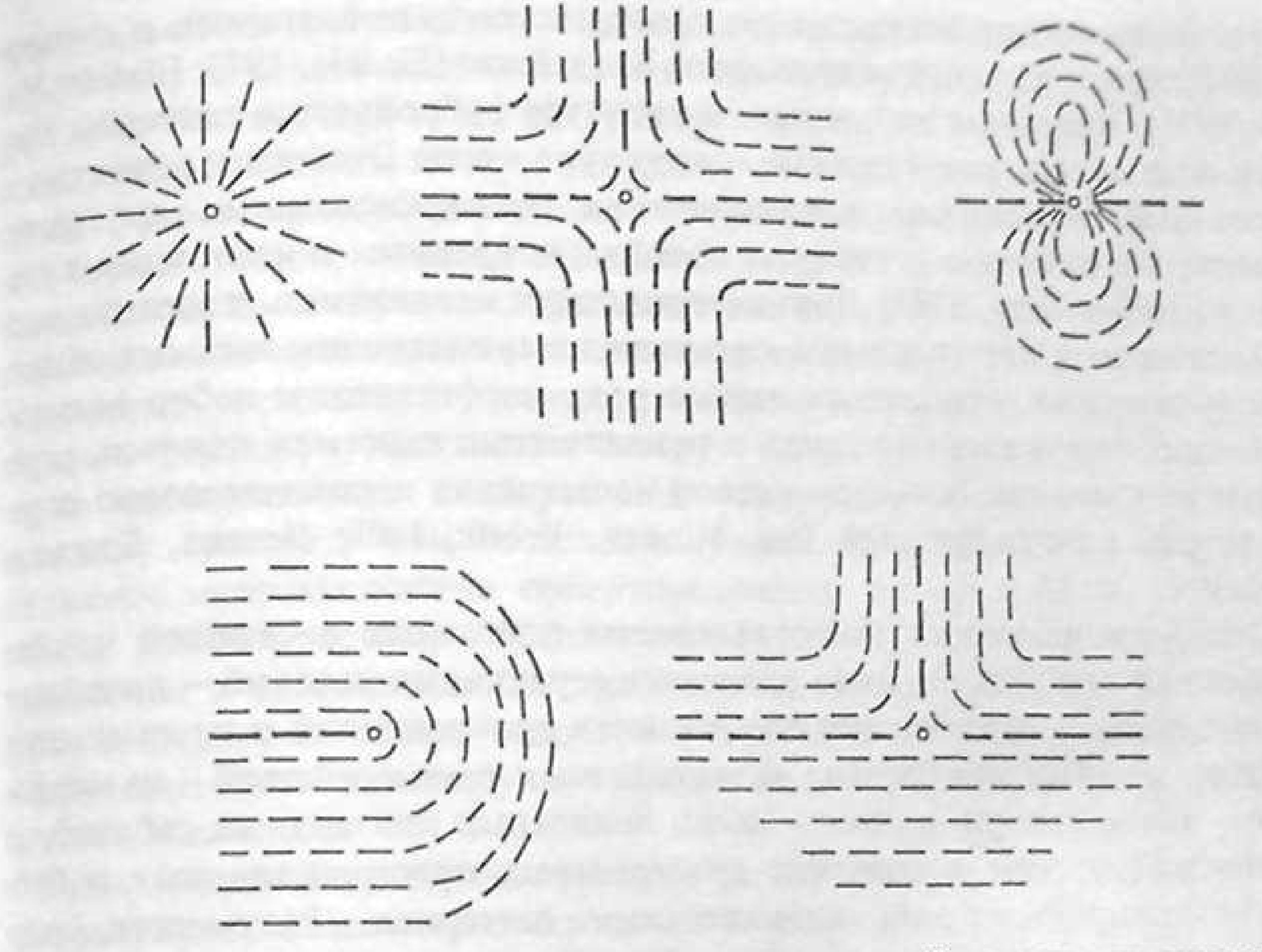


Рис. 125. Схема топологических паттернов пространственной организации миогенных клеток в однослойной культуре

дающих позиционную информацию о пространственном расположении клеток, наблюдается самоорганизация потоков движущихся клеток и возникновение упорядоченных структурных паттернов, подобных таковым дерматоглифики. В однослойных культурах фибробластов или миобластов такая пространственная самоорганизация на плоскости спонтанно развертывается в результате игры сил контактного ингибирования движения клеток и линейной контактной ориентации клетка–клетка, что приводит к локальному параллельному расположению биполярных клеток. При столкновении клеточных потоков возникают планарные паттерны с топологическими сингулярностями (рис. 125 и гл. IV). Подобное спонтанное структурирование в однослойной культуре обнаружено на агрегирующих клетках акразиевого миксомицета Dictyostelium discoideum (см.: Потапова и др., 1987). В культурах эпидермальных клеток человека наблюдалось развитие спиральных завитков, сходных с картинами дерматоглифики (Green, Thomas, 1978), порождаемыми in vivo в ходе дифференциации этих клеток в составе тканевой и организменной систем. Однако топологические сингулярности, сходные с паттернами дерматоглифики (петли, дуги), возникают и в однослойной культуре миобластов, фибробластов, т.е. клеток внутренней среды организма, пространственная организация которых in vitro существенно отличается от наблюдаемой в организме. В таких случаях клетки in vitro выходят за рамки диктуемой организмом программы надклеточных пространственных паттернов, степень свободы самоорганизации культивируемых клеток и их ансамблей оказываются выше, чем в организме.

Топологическое исследование пространственных паттернов в культуре фибробластов впервые проведено Элсдейлом (Elsdale, 1973; Elsdale, Wasoff, 1976). Подобные найденным в культуре фибробластов паттерны описаны и на совсем иной системе – кутикуле клопа Dysdercus; вероятно, и клеточные механизмы возникновения пространственных паттернов ориентации зубчиков кутикулы подобны найденным в клеточных культурах (Nübler-Jung, 1987). Помимо клеточных механизмов генерации пространственных паттернов самоорганизации существенны и самые общие, топологические ограничения такого рода морфогенезов: набор возможных топологических паттернов в нематических системах конечен, ограничен не слишком большим числом качественно и количественно определяемых сингулярностей (см. Mineev, Vobvik, 1988; Исаева, Преснов, 1990а).

Итак, исследования самоорганизации клеточных ансамблей in vitro позволяют выявить влияние физических граничных условий – линейных и плоскостных ограничений возможности прикрепления и перемещения клеток, а также контактных межклеточных взаимодействий – на морфогенез, иначе говоря, выявить вклад локальных контактных событий на клеточном уровне в создание интегральных пространственных и пространственно-временных надклеточных паттернов. Разумеется, осуществление контактных взаимодействий не исключает возможности установления в клеточных системах диффузионных градиентов с диффузией морфогенов типа активаторов и ингибиторов или эмбриональных индукторов. Имеющиеся в настоящее время данные о влиянии внеклеточного матрикса и отдельных его компонентов на генную экспрессию в ходе развития приводят к заключению о контролирующей цитодифференциацию роли внеклеточного матрикса, в значительной мере выполняющего функцию гипотетических морфогенов. Однако исследования на клеточных культурах дают ясные свидетельства как необходимости физической анизотропии среды для морфогенеза, так и возможности получения клетками позиционной информации о пространственной организации надклеточных ансамблей от физических граничных условий – физические границы могут служить источником позиционной информации в биологическом морфогенезе, референтными линиями и плоскостями морфогенетических полей.

Определенные физические условия оказываются необходимыми и для генерации клетками механического стресса. Морфогенетические движения на клеточном и надклеточном уровнях – проявления механической работы клеток; клетки способны деформировать гибкий субстрат in vitro, создавая механическое натяжение (Harris et al., 1980, 1981; Harris, 1986). С другой стороны, для генерации механического стресса необходимо закрепление клеток на достаточно ригидном субстрате. Формирование пучков актиновых филаментов при распластывании и движении клеток, по-видимому, зависит от локальных механических натяжений, определяемых фокальными контактами клетка–субстрат (см. Kolega, 1986b; Vasiliev, 1987).

Механический стресс оказывает контролирующее влияние на синтетическую и митотическую активность клеток, их двигательное поведение и морфогенез надклеточных систем (см.: Белоусов, Мещеряков, 1986; Kolega, 1986b; Vandenburgh et al., 1991). В суспензионной культуре невозможность прикрепления клеток к твердому субстрату ведет к подавлению цитодифференцировок, связанных с приобретением геометрически сложной формы клеток, которая зависит от сборки микротрубочек, микрофиламентов, промежуточных филаментов (см. гл. IV). Миосимпласты из суспензионной культуры почти лишены микротрубочек, а пучки миофиламентов располагаются в поверхностном слое цитоплазмы симпласта, нередко формируя завихрения вокруг ядер. Но после прикрепления таких миосимпластов с анархичной ультраструктурой цитоскелета к твердому субстрату они постепенно удлиняются и вытягиваются, появляются многочисленные ориентированные по продольной оси симпласта микротрубочки, параллельно расположенные промежуточные филаменты и организованная саркомерная зона. Прикрепление к твердому субстрату (к тканям опорной системы) и натяжение симпласта – необходимое условие для упорядоченного миофибриллогенеза и полноценного миогенеза.

Стимулирующая и ориентирующая роль механического натяжения в миофибриллогенезе экспериментально доказана на культивируемых скелетно-мышечных (Vandenburgh, 1982, 1983; Vandenburgh et al., 1991) и гладкомышечных клетках (Dartsh, Hämmerle, 1986; Dartsch et al., 1986); влияние механического натяжения на ориентацию актиновых филаментов и микротрубочек ясно выявлено на многих эпителиальных системах (Kolega, 1986b). Таким образом, субстрат для прикрепления клеток оказывается носителем позиционной информации, не только дающим граничные условия, но и обеспечивающим механическое натяжение клеток и их отростков.

Показано, что сократительная активность, механический стресс существенно модулируют экспрессию генов специфичных для мышечных клеток изоформ сократительных белков или даже необходимы для активации транскрипции этих генов (Cerny, Bandman, 1986; Periasamy et al., 1989; Karas, Williams, 1991; Schneider et al., 1991); механизмы такого отклика на физический стресс не ясны.

Зависимость же структурной организации цитоскелета от векторизованного механического воздействия в какой-то мере может быть понята при рассмотрении упорядоченной архитектоники клеток и надклеточных систем как жидкокристаллических структур с анизотропной проводимостью и механоэлектрическими (пьезоэлектрическими) свойствами (Исаева, Преснов, 1990а). Пьезоэлектрические свойства линейных элементов цитоскелета и внеклеточного матрикса могут обеспечивать адаптацию клеток и их систем к механической деформации как одному из физических параметров внешнего окружения: механическое воздействие вызывает электрическую поляризацию или изменение прежнего паттерна электрического поля (прямой пьезоэлектрический эффект), а вновь образуемые элементы ориентируются в зависимости от направления силовых линий электрического поля (обратный пьезоэлектрический

эффект). Полипептидные полимеры цитоскелета, вероятно, обладают пьезоэлектрическими свойствами (что известно, в частности, для актимиозинового комплекса – см.: Hawkins, April, 1983). Именно пьезоэлектрические свойства – объяснение неоднократно найденного феномена ориентации линейных структур цитоскелета-цитомускулатуры по линиям механических натяжений и тем самым объяснение возможности адаптации клеток и их систем к физическим параметрам внешнего мира.

ПРОСТЕЙШИЕ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫЕ И МЕЗЕНХИМНЫЕ МОРФОГЕНЕЗЫ: МОДЕЛЬНЫЕ КЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ IN VITRO

Клетки многоклеточных животных можно разделить на два больших *типа: эпителиальные и мезенхимные* (см.: Hay, 1984). *Эпителии* покрывают наружную и внутреннюю поверхности тела и представляют собой слитный, непрерывный клеточный пласт лежащих на базальной пластинке (внеклеточном матриксе) поляризованных по апикально-базальной оси *клеток, связанных друг с другом системой специализированных* контактных зон, которые реализуют надклеточную интеграцию цитоскелета (см.: Kolega, 1986b).

Положение о надклеточной интеграции цитоскелета как основе пространственно-временной *морфофункциональной интеграции* клеток в развивающихся тканях впервые четко сформулировал Такер; в его работах приведены и конкретные факты координированного расположения актиновых филаментов и микротрубочек в эпителиальных и других системах (Tucker, 1981, 1984). Интеграция цитоскелета клеток эпителиев осуществляются через зоны специализированных клеточных контактов (рис. 126): актиновых филаментов – через zonulae adhaerens и промежуточных филаментов – через десмосомы (см.: Geiger et al., 1984; Mooseker, 1985; Fey, Penman, 1986). Удивительно регулярный паттерн и отчетливая координированность цитоскелета в эпителии губки послужили основанием для удачного наименования такой интегрированной цитоскелетной системы – "гистоскелет" (Pavans de Ceccatty, 1986). Характерное для эпителиальных морфогенезов изгибание пласта реализуется коодинированным в пространстве и времени сокращением колец актиновых филаментов, опоясывающих каждую клетку на уровне zonulae adhaerens (обзоры: Kolega, 1986b; Fristrom, 1988).

Вызванное в эксперименте координированное сокращение апикальных колец клеток пигментного эпителия сетчатки вызывает переход от двумерного плоского клеточного пласта к чашевидной форме (Owaribe, 1983). Необычная бластуляция диссоциированных бластомеров морской звезды и морского ежа (см. гл. II) – подобный типично эпителиальный морфогенез, вероятно осуществляемый координированным функционированием интегрированного надклеточного "гистоскелета".

Существование пространственно-временного согласования функций цитоскелета-цитомускулатуры в многоклеточных компартментах дает основания для моделирования подвижности не только клеток и симп-

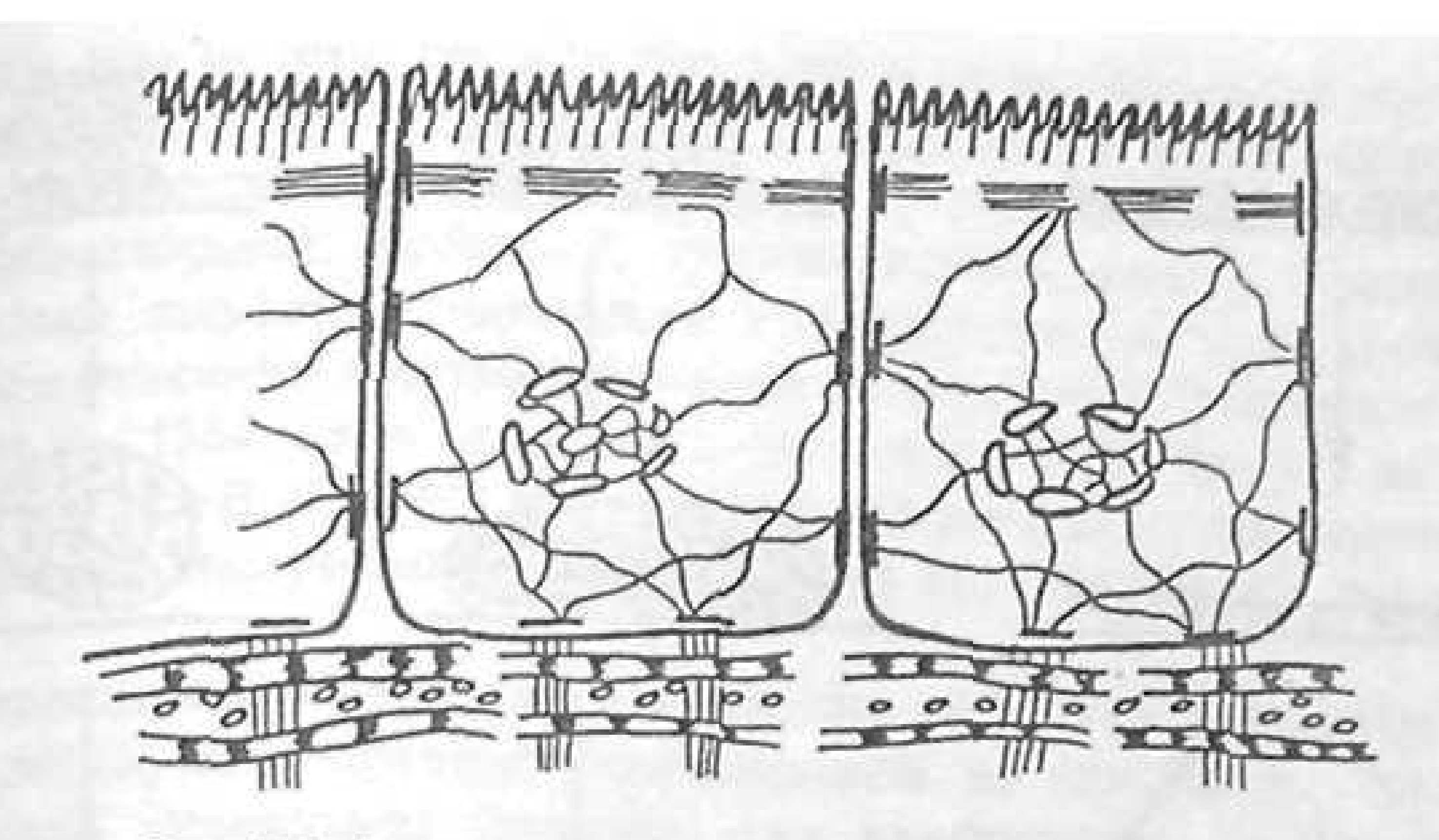


Рис. 126. Схема надклеточной интеграции цитоскелета

ластов, но и надклеточных интегрированных систем как сократимого актомиозинового геля. Предложены весьма разработанные механохимические модели эпителиальных морфогенезов, успешно объясняющие возникновение некоторых морфогенетических паттернов (Odell, 1984; Oster, 1983; Oster, Odell, 1984). Модель эпителиальных морфогенезов, связанных с локальными механическими натяжениями и контактной поляризацией клеток части эпителиального пласта, что ведет к подразделению пласта на домены морфологически поляризованных и неполяризованных клеток, предложена Б.Н. Белинцевым, Л.В. Белоусовым и А.Г. Зарайским (1985). Показано, что при эстафетной контактной поляризации клеток зародышей осуществляется координированная перестройка цитоскелета (Белоусов, Лучинская, 1983). Итак, функционирование интегрированного "гистоскелета" – движущая сила эпителиальных морфогенезов, как и морфогенетических преобразований иных надклеточных систем.

Для поддержания целостности и анизотропии тканей, помимо межклеточных контактов, важен контакт клеток с внеклеточным матриксом (Bissell et al., 1982; Hay, 1982, 1984; Bissell, Barcelos-Hoff, 1987). Ключевая роль коллагена – *одного из компонентов* базальной мембраны – в детерминации полярности эпителия экспериментально доказана инверсиями полярности культивируемых клеток щитовидной железы, индуцируемыми коллагеном (Chambard et al., 1981; Barriere et al., 1986); здесь коллаген – *носитель позиционной информации*. Обнаружены и другие инверсии полярности, зависящие от отношений "внутри–снаружи", т.е. индуцируемые инверсиями анизотропии среды (см.: Ivanov, 1971; Преснов, Исаева, 1985) и, вероятно, определяемые локализацией внеклеточных лигандных молекул. *Организация внеклеточного матрикса* скоррелирована с внутриклеточной и надклеточной структурой цитоскелета и гистоскелета через полудесмосомы (см. рис. 126; Ellison, Garrod, 1984).

Исследования in vitro позволяют выделить элементарные акты эпителиальных морфогенезов как *коллективных клеточных* реакций (рис. 127). Первый этап проявления эпителиального морфогенеза – смыкание изолированных (или слабо связанных друг с другом) сфероидных клеток

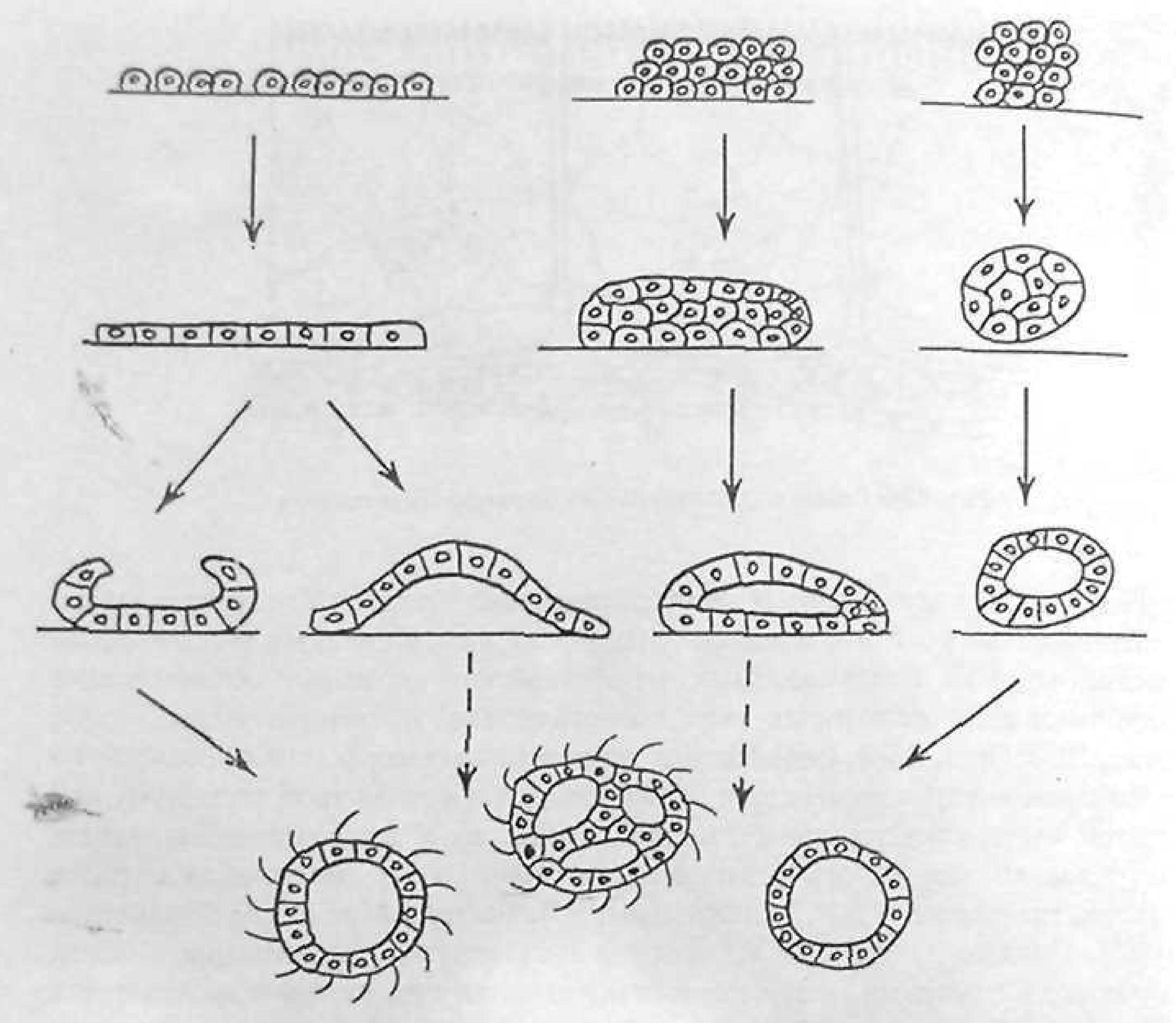


Рис. 127. Схема эпителиальных морфогенезов в однослойной культуре

в единый пласт полигональных, объединенных специализированными контактами клеток (рис. 127, см. также гл. II).

Второй шаг эпителиального морфогенеза – изгибание эпителиального слоя, переход от двумерной организации клеточного ансамбля к трехмерной, осуществляемый координированным в пространстве и времени функционированием интегрированного гистоскелета. Это типичный для эпителиев способ морфогенеза, широко эксплуатируемый в развитии животных, известными примерами которого служат гаструляция путем инвагинации, энтероцельное образование мезодермы у вторичноротых, нейруляция у хордовых, морфогенез различных плакод и желез. В культурах клеток второй акт эпителиального морфогенеза реализуется либо изгибанием вверх краев небольшого изолированного участка эпителизованного пласта вверх (см. гл. II), либо путем образования куполообразных возвышений (domes) в едином эпителиальном слое (Goodman, Crandall, 1982; Sugahara et al., 1984; Lee et al., 1985; Bissell, Barcelos–Hoff, 1987; см. рис. 127).

Наконец, возможен и третий этап морфогенеза – смыкание краев эпителиального пласта с образованием замкнутого полого сфероида (см.

рис. 127). Как in vitro, так и in vivo далеко не все процессы морфогенеза эпителиальных структур приводят к подобному итогу. Образованию замкнутых *фолликулоподобных* структур клетками различных эпителиев (щитовидной, молочной, поджелудочной желез, почки), как и экспрессии дифференцированного цитофенотипа in vitro, способствует культивирование в трехмерном коллагеновом геле (Chambard et al., 1981; Garbi et al., 1984; Chen et al., 1985; Montesano, 1985; Barriere et al., 1986; Bissell, Barcelos-Hoff, 1987), что свидетельствует о влиянии внеклеточного матрикса на экспрессию генома (Bissell et al., 1982; Bissell, Barcelos–Hoff, 1987).

В мезенхимных морфогенезах исходно участвуют отдельные подвижные клетки, как правило происходящие из эпителиев. Так, клетки первичной мезенхимы морского ежа иммигрируют в бластоцель из вегетативной области эпителизованной бластулы, *теряя ресничку* и претерпевая таким образом эпителиомезенхимную, моноцилиарно-амебоидную трансформацию, подобно моноцилиарным целомоцитам морского ежа – производным целомического эпителия (см. гл. III и V). Миогенные клетки позвоночных мигрируют к месту их конечной локализации и дифференцировки из сомитов (см. гл. IV), организованных как типичный эпителий (см., напр., Murakami et al., 1989), т.е. и предшественники миогенных клеток проходят эпителиомезенхимную трансформацию.

Варианты мезенхимных морфогенезов в однослойных культурах клеток изображены на рис. 128. Для большинства клеток мезенхимного типа характерна мультиполярность, множественность клеточных отростков; при этом территория, занимаемая клеткой, превышает ее площадь. Пространство между клеточными отростками in vivo может быть занято внеклеточным матриксом или (и) другими клетками. Попутно можно заметить, что отнесение нейронов (возникающих, как известно, из нейроэпителия) к клеткам эпителиального типа (см.: Hay, 1984) вряд ли корректно. Эпителиальные и нервные клетки *объединяет лишь отчетливая* поляризованность; нейроны скорее оказываются клетками промежуточного между эпителиальными и мезенхимными типа (да и само разделение клеток на два типа достаточно схоластично, хотя и удобно).

Сети многоотростчатых мезенхимных клеток могут дифференцироваться различным образом. В частности, возможна биоминерализация, внутриклеточная у ранних зародышей морского ежа (гл. III) или внеклеточная, примером которой может служить остеогенез у позвоночных. Нередко слияние клеток в синцитии или симпласты (гл. III–V, см. рис. 128).

Помимо экспрессии программы той или иной специфической цитодифференцировки, мезенхимные клетки способны создавать in vitro упорядоченные пространственные паттерны, не свойственные им в организме. Миграция из агрегатов клеток первичной мезенхимы, миогенных, целомоцитов приводит к возникновению радиальных или звездчатых паттернов (см. рис. 128). Механизм построения такого паттерна – контактное ингибирование клеточного движения (см.: Abercrombie, 1977;

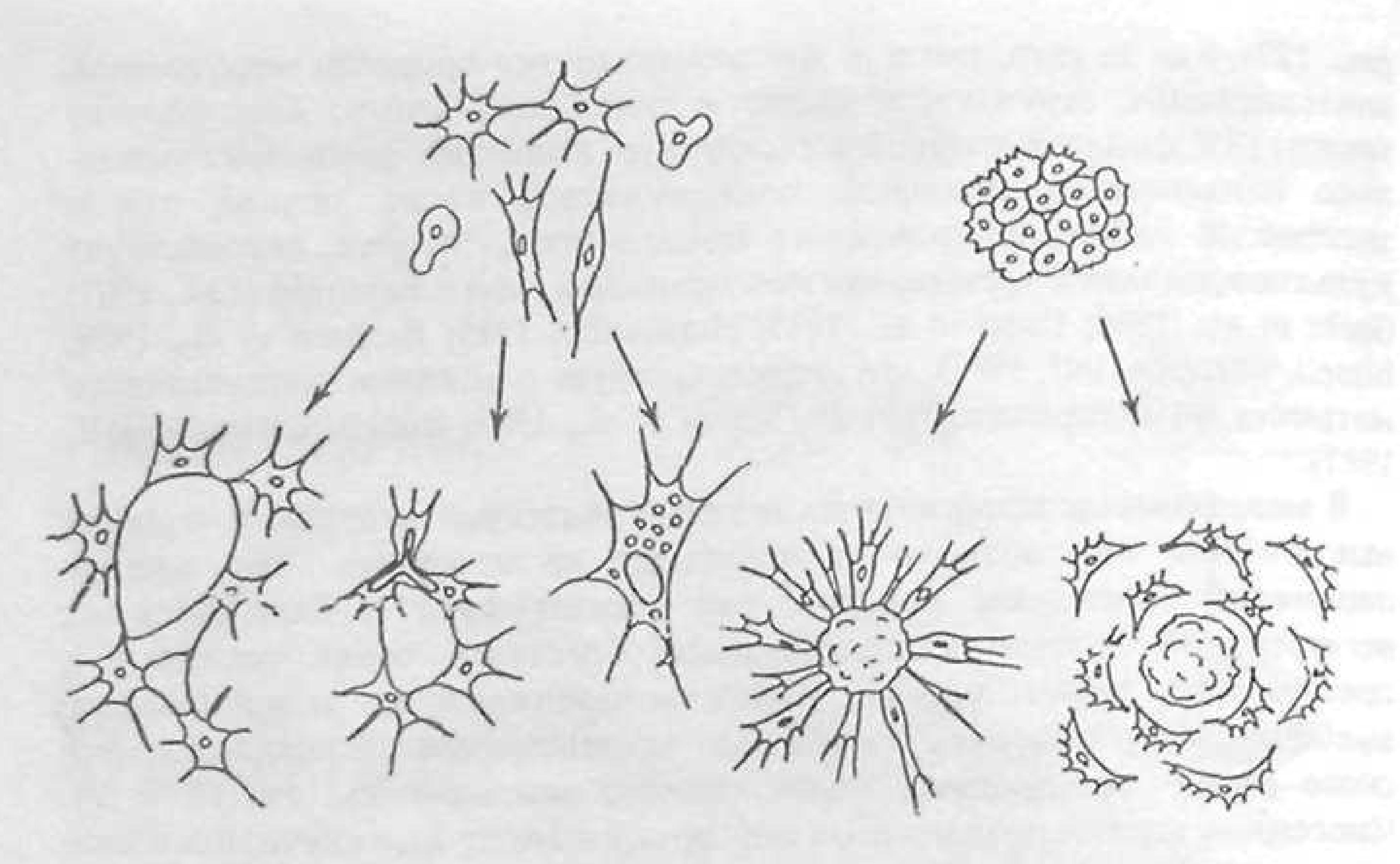


Рис. 128. Схема мезенхимных морфогенезов в однослойной культуре

Lackie, 1986). Гемоциты некоторых двустворчатых моллюсков – устрицы Crassostrea virginica (Fisher, 1986), мактры Mactra sulcataria (наши неопубл. данные), в отличие от большинства клеток, при направленном движении вытягиваются перпендикулярно вектору перемещения клетки, а не вдоль него. В итоге при миграции таких гемоцитов из агрегата возникает своеобразный паттерн "разбегающихся волн" (см. рис. 128).

Выселяющиеся из агрегатов клетки устанавливают между ними мостики, подобные описанным на других клеточных культурах (Weiss, 1952). Подобные же мостики появлялись в культурах фибробластов или фибробластоподобных клеток, растущих на гибком деформируемом субстрате либо коллагеновом геле–клетки генерируют механические натяжения, усиливающие анизотропию системы и дающие импульс к дальнейшему морфогенезу путем контактной ориентации и контактного *направления движения клеток вдоль линий натяжения между скоплениями* клеток (Harris, 1986). Пространственно-временные паттерны морфогенеза, зависящие от механического натяжения клеточных тяжей-мостиков между агрегатами клеток, наблюдались в миогенной культуре (см. гл. IV).

Упорядоченный, близкий к гексагональному паттерн распределения агрегатов миогенных клеток или целомоцитов очень сходен с описанным на культурах фибробластов (Harris et al., 1984). Генерация in vitro такого рода упорядоченных паттернов (сходных с картинами некоторых мезенхимных морфогенезов in vivo), обусловленная физическими, механическими силами, дала основание Харрису с соавторами предложить альтернативное модели диффузии химических морфогенов объяснение контроля морфогенеза (Harris et al., 1984).

Надклеточная интеграция цитоскелета через зоны контактов клетка–клетка найдена не только в эпителиальных, но и в мезенхимных клеточных системах (например, Sanger et al., 1983). В мезенхимных надклеточных ансамблях клетки и внеклеточной матрикс, объединяемые реципрокными детерминирующими влияниями, составляют интегрированную систему. Отростки клеток, *проникающие* во внеклеточное вещество, по-видимому, организуют расположение фибрилл продуцируемого ими коллагена (Birk, Trelstad, 1985; Murray, Tanzer, 1985). Экспериментально засвидетельствована также способность клеток активно деформировать субстрат и влиять на ориентацию фибрилл *коллагена и фибрина, причем* контактная ориентация клеток вдоль фибрилл замыкает петлю обратной связи клетка–внеклеточный матрикс (Stopak, Harris, 1982; Grinnell, Lamke, 1984; Harris, 1986; Klebe et al., 1989).

Позиционная информация, получаемая клеткой через локальные контактные взаимодействия клетка–клетка и клетка–внеклеточный матрикс, определяет глобальный фенотип дифференцированных эпителиальных и мезенхимных клеток. Упомянутые выше механизмы взаимодействий клеток с внеклеточными структурами ведут к интеграции их морфогенеза и созданию крупномасштабных жидкокристаллических компартментов (см.: Исаева, Преснов, 1990а). Упорядоченность организации интегрированной надклеточной жидкокристаллической структуры проявляется, в частности, в генерации электрического поля. Осевой паттерн этого поля, вероятно, детерминируется не только анизотропией поля распределения ионных насосов и ионных каналов мембраны (Almers, Stirling, 1984; Stern, 1984), но и наличием внутриклеточных "кабелей", которыми могут служить полипептидные цепи цитоскелетных структур. *Возможность перемещения электронов (электросолитонов) по* альфа-спиральным цепям белковых молекул (Давыдов, 1986) дает теоретическую основу для предположения о направленном трансклеточном токе вдоль ориентированных элементов цитоскелета. Вероятно, морфо*функциональная упорядоченность поляризованных клеток и их систем* распространяется и на супрамолекулярный уровень, самоподдерживаясь и усиливаясь путем включения пьезоэлектрического эффекта и векторизации внутриклеточного конвейера (Исаева, Преснов, 1990а).

ПРЕЕМСТВЕННОСТЬ ПАТТЕРНОВ ОРГАНИЗАЦИИ КАК ЭПИГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПАМЯТЬ КЛЕТОК И НАДКЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ

Преемственность паттернов в ходе развития так или иначе обусловлена запоминанием прошлого состояния. По Уолперту (Wolpert, 1981), интерпретация клетками позиционной информации и приобретение ими определенного позиционного значения вовлекают долговременную память. Появилась уже общая концепция биологической памяти (Ашмарин, 1975; Chandebois, Faber, 1983). Ашмарин различает четыре формы биологической памяти: генетическую, эпигенетическую, иммунологическую и

нейрологическую; им определены общие черты и особенности форм биологической памяти. Кибернетический подход также неизбежно ведет к разработке общих представлений о биологической памяти как системе записи, хранения и считывания информации, выходящей за рамки прежних понятий о нейрологической памяти (Ляпунов, 1984). Рассмотрение клеточной и надклеточной эпигенетической памяти – лишь частный аспект исследований процессов управления и передачи информации в биологических системах. Термин "эпигенетический" традиционно применим к наследуемым в ряду клеточных поколений изменениям, характеризующим цитодифференцировку и как бы накладывающимся на генетическую информацию (Ашмарин, 1975; Нейфах, Лозовская, 1984). Введение в клеточную биологию термина "память" было бы логическим следствием уже общепринятого употребления применительно к клетке терминов "рецептор" и "поведение". Ведь рецепция сигнала извне и поведенческий (или иной) ответ клетки на него невозможны без каких-либо механизмов, обеспечивающих передачу сигнала и хранение следов воздействия извне, т.е. клеточной памяти о прошлом событии.

Организации элементов цитоскелета поляризованной клетки определяет характер последующей псевдоподиальной активности; в каждый данный момент паттерн цитоскелета – результат интеграции, запоминания клеткой предыдущих псевдоподиальных реакций (Vasiliev, 1982). О способности клеток анализировать и запоминать позиционную ситуацию свидетельствует также выбор направления движения после клеточного деления или столкновения клеток (Albrecht-Buehler, 1985a,b) и сохранение выбранного направления (Trinkaus, 1984). Безъядерные фрагменты клеток проявляют способность к автономному амебоидному движению, реакции поляризации и контактного ингибирования (Albrecht-Buehler, 1985a; Gelfand et al., 1985; Александрова и др., 1986); по-видимому, система рецепции и двигательного ответа, включающая запоминание, у клеток многоклеточных животных может функционировать независимо от одновременной активности генома.

Стабильность связанных с плазматической мембраной центров организации актиновых филаментов, вероятно, лежит в основе восстановления микроворсинок кишечных клеток после обратимой деполимеризации актиновых филаментов (см.: Tilney, Tilney, 1984), а также, возможно, запоминания морфологии рельефа культивируемыми клетками (Rovensky, Vasiliev, 1984).

Клеточная память, вовлекаемая в обратимый физиологический ответ (например, хемотаксис) может быть отнесена к кратковременной, оперативной памяти клетки. В других же случаях – при воспроизведении морфофункциональных особенностей клетки после временной утраты их экспрессии – вероятно, функционируют механизмы долговременной, более стабильной клеточной памяти.

Долговременная эпигенетическая память клетки, обусловленная цитоплазматической анизотропией, ясно выражена при асимметричном митозе соматических клеток, причем различия фенотипа дочерних клеток, по-видимому, как и при дроблении яиц, зависят от разнокачественности цитоплазмы, различного распределения морфогенетических детерминантов в дочерние клетки, а не от хромосомных различий (см.: Duspiva, 1978).

Пытаясь найти некоторые общие черты эпигенетической внеядерной памяти и традиционно понимаемой нейрологической памяти, кратко рассмотрим проявления последней на уровне нейрона и синапса. Нейрологическая память – функция системы нейронов, связанных синаптическими контактами. Согласно концепции синаптической пластичности, процесс научения осуществляются путем изменения числа и функциональной активности сипапсов (Кэндел, 1980; Cotman, Sampedro, 1984). Исследование реакций нейрона и синапса выявило элементы научения и памяти на клеточным и субклеточном (синаптическом) уровнях. Пример синаптической памяти – депрессия синаптической передачи при повторной стимуляции. Как в пре-, так и постсинаптических образованиях выявлена высокая концентрация фибриллярного актина, а также миозина и спектрина (Fifkova, Delay, 1982; Matus et al., 1982; Connolly, 1984; Drenckhahn et al., 1984). Эти данные привели авторов первых двух цитированных работ к предположению о роли комплекса синаптическая мембрана–цитоскелет как субклеточной основы нейрологической памяти.

В яйцевых клетках различных животных выявлено высокоупорядоченное, анизотропное распределение морфогенетических детерминантов разнообразной природы, программирующих последующее эмбриональное развитие (см. гл. I). Поэтому цитоархитектонику яйца можно рассматривать как яркую модельную систему для исследования структур и процессов, обеспечивающих фиксацию, хранение, преобразование и реализацию существенной для морфогенеза эпигенетической информации внеядерной локализации. Память яйцевой клетки о ее положении относительно клеточных и неклеточных структур яичника сохраняется и после потери контакта с ними; позиционная информация, получаемая яйцевой клеткой в ходе оогенеза, прочно запоминается ею и доносится как материнский эффект до конца жизни развивающегося из яйца организма. Если анимально-вегетативная ось яйца почти всех животных детерминируется в процессе оогенеза, то дорсовентральная ось у разных представителей билатеральных животных устанавливается в разное время до или после оплодотворения. По крайней мере среди хордовых (у асцидий и амфибий) при нормальных условиях оплодотворения и развития детерминации этой второй основной оси сопряжена с проникновением спермия. "Память" о месте вхождения спермия сохраняется кортексом яйца в течение длительного времени, проявляясь в локальных особенностях рельефа поверхности яиц амфибий (Picheral, Charbonneau, 1982), яиц и ооцитов морского ежа (Okazaki, 1975; Longo, 1986); некоторые меченые компоненты поверхности спермия могут сохраняться в виде дискретного пятна в кортексе яйца мыши в ходе дробления, а у морского ежа – даже до стадии раннего плутеуса (Gunderson, Shapiro, 1984).

Более существенно, что память о взаимодействии яйца и спермия у представителей хордовых, память о локальных контактных взаимодейст-

виях ооцита с клеточными и неклеточными структурами гонады у всех животных – необратимая память типа импринтинга, запечатленная в последующих осевых паттернах развивающегося организма. Поляризация яйца или споры растений также обусловлена возникновением и стабилизацией апикально-базальных осевых различий, транслируемых в ходе развития в основную ось дефинитивного организма, что полностью сопоставимо с поляризацией яиц животных (Brawley, Robinson, 1985; Quatrano et al., 1985; Turian, 1985). Выше приведены свидетельства того, что интегрированная цитоскелетная система яйца в комплексе с мембранными системами – глобальный детерминат, определяющий проморфологию, осевой паттерн яйца, переводимый в ходе развития в осевой паттерн зародыша и взрослого организма и тем самым характеризующийся общим для всех организмов материнским эффектом.

Если для осуществления цитодифференциации и физиологических реакций дифференцированных клеток необходимо получение позиционной информации из окружающей среды, то яйцо как одноклеточный канал связи между поколениями несет необходимую для будущего развития позиционную информацию в ооплазме и изолируется от сигналов внешней среды. Защита памяти яйца от всех помех, шумов окружения осуществляется оболочками, выполняющими защитную реакцию в более широком смысле, чем это обычно понималось. После получения единственной необходимой яйцу для начала развития информации – контакта и слияния со спермием – изоляция обычно усиливается за счет экзоцитоза и образования дополнительной оболочки. "Глухота" яйца к сигналам внешнего окружения ясно проявляется, в частности, в отсутствие контактных реакций на субстрат, на другие клетки. Эффективность системы защиты памяти яйца на субклеточном уровне проявляется в стабильности комплексирования мРНК с белками, прочной фиксации мРНК и других макромолекулярных комплексов и органелл цитоскелетной сетью, а также в частичной резистентности цитоскелетных структур яйца к ингибиторам. Резистентность к обработке цитохалазином найдена у зигот бурых водорослей (Brawley, Robinson, 1985), яиц шпорцевой лягушки (Christensen, Merriam, 1982; Merriam et al., 1983) и бластомеров мыши (Johnson, Maro, 1985). Вероятно, устойчивость к цитохалазину зависит от прочного связывания субмолекулярных мишеней действия ингибитора актинсвязывающими белками. Именно стабильный комплекс фибриллярного актина с актинсвязывающими белками и мембранными компонентами – наиболее вероятный (но не единственный) материальный субстрат долговременной памяти и яйцевых, и соматических клеток. Такого рода гипотетический кортикальный "локус памяти" – пример "законсервированной" позиционной информации – формируется до видимого проявления поляризации бластомера мыши и служит организатором, определяющим ось поляризации; при асимметричном делении этот участок наследуется бластомером линии трофэктодермы (Johnson, Maro, 1985). Становление поляризованного состояния бластомеров зависит, по-видимому, от функционирования микротрубочек и актиновых филаментов цитоскелета, однако кортикальный "локус памяти" (предположительно участок цитоскелетного матрикса) проявляет, как уже упоминалось, определенную резистентность к действию ингибиторов цитоскелета (Johnson, Maro, 1985). Вероятно, после установления кортикальной анизотропии и стабилизации структур, обеспечивающих память об этой анизотропии, устойчиво измененное состояние кортекса влияет на ориентацию системы микротрубочек, что ведет к усилению предсуществовавшей полярности, направляя внутриклеточный транспорт (Brawley, Robinson, 1985; Johnson, Maro, 1985).

Таким образом, накапливаются факты, позволяющие по-новому увидеть цитоплазму – как носитель интеллекта, характеризуемого, подобно интеллекту компьютера, способностью воспринимать информацию извне, обрабатывать ее и осуществлять целесообразный ответ (Chandebois, Faber, 1983; Albrecht-Buehler, 1985a,b). Мы полагаем, что такая переработка полученной извне позиционной информации ясно выражена в интегральной реакции поляризации клетки – перестройке всего комплекса цитоскелета и цитомембран в ответ на локальный сигнал.

Память о пространственном взаиморасположении ооцита и других клеточных и неклеточных структур яичника, взаимодействии яйца и спермия, взаимодействиях бластомеров сохраняется до конца жизни организма – необратимая, раз и навсегда устанавливаемая память типа импринтинга, запечатления во всех последующих осевых паттернах зародыша и взрослого организма (Исаева, 1990а; Исаева, Преснов, 1990а).

В ходе индивидуального развития происходит последовательная смена доминирующих носителей позиционной информации с переходом от материнского, ооплазматического контроля к зиготическому, к взаимодействиям бластомеров, затем дифференцирующихся клеток и их комплексов. Включение пространственно-временной программы экспрессии генома зародыша, наиболее изученной у дрозофилы, зависит от материнских генов, контролирующих переднезадний и дорсовентральный паттерн посредством анизотропной ооплазматической локализации продуктов этих регуляторных генов (Scott,O'Farrell, 1986; Nüsslein-Volhard, 1991; Ray et al., 1991; см. также гл. II). Материнский генный контроль ооплазматической локализации и тем самым судьбы клеток в развитии, найден и у нематоды Caenorhabditis elegans (Morton et al., 1992). Поскольку короткая обработка оплодотворенных яиц C. elegans до начала дробления цитохалазином вызывает появление фенокопий мутации, нарушающей ооплазматическую локализацию, кажется вполне вероятным, что данный ген (par) кодирует один из белков системы актиновых филаментов (Hill, Strome, 1990). У дрозофилы найдена мутация материнского эффекта, затрагивающая реорганизацию фибриллярного актина и распределение ядер раннего эмбриона (Hatanaka, Okada, 1991a,b). Выявленная у зародыша дрозофилы неоднородная, периодичная организация системы микротрубочек в виде 14 полос наводит на мысль о роли микротрубочек в создании подобного же периодичного паттерна экспрессии генов сегментации (Callaini, 1989).

Так становятся более ясными реципрокные взаимодействия генома и цитоскелета яйцевой клетки, глобального детерминанта проморфологии:

в процессе существенной переработки, перераспределения морфогенетической информации при ооплазматической сегрегации, при контактной поляризации бластомеров основная осевая организация яйца и зародыша оказывается преемственной, детерминируя осевую анизотропию всех последовательно сменяющих друг друга паттернов, определяя в конечном итоге и ось взрослого организма.

Оплодотворенное яйцо служит Ноевым ковчегом, переносящим всю необходимую для развития организма генетическую и эпигенетическую информацию от поколения к поколению, снабженным картой (осевой координатной системой регуляции последующей дифференциальной экспрессии) и часами – как локализованными в цитоплазме механизмами отсчета времени, что обусловлено запоминанием прежнего состояния (см.: Исаева, 1990а), так и иерархической организацией каскада генной экспрессии в ходе развития.

Деления дробления разбивают анизотропную ооплазму на клеточные территории отдельных бластомеров, осуществляется переход к экспрессии зиготического генома с дифференциальной активацией его в различных регионах. *Карта зачатков зародыша на языке молекулярной биологии* – распределение наборов специфических рецепторов: молекул клеточной адгезии, опосредующих взаимодействие клетка–клетка (Edelman, 1984, 1986, 1991) и интегринов (см.: Hynes, 1987, 1990) – посредников *взаимодействий клеток с молекулами внеклеточного матрикса*. Синтез одними группами клеток специфических же наборов и типов молекул внеклеточного матрикса (фибронектина, коллагена, ламинина, протеогликанов) направляет морфогенетические перемещения других *клеток, причем для прикрепления и миграции клеток* существенны не только химические, но и физические свойства субстрата. Так пространственно-временная динамика морфогенетических паттернов в развитии непрерывно контролируется и генетической и позиционной (*эпигенетической*) *информацией*.

Поддержание структурной и функциональной анизотропии дифференцированной соматической клетки зависит от целостности всего тканевого комплекса и вовлекает долговременную позиционную память *многоклеточных ансамблей* (Smith, 1979; Kim, Stocum, 1986) *или коллективную* клеточную память (Chandebois, Faber, 1983). Стабилизация клеточного фенотипа, по всей видимости, опосредуется иммобилизацией рецепторных, транспортных и других компонентов клеточной поверхности путем *связывания изнутри – с цитоскелетными структурами и снаружи* – с внеклеточными молекулами. Зависящая от специфики внеклеточных структур память обнаружена в экспериментах по регенерации синаптических образований после разрушения мышечного и нервного клеточных *элементов с сохранением лишь базальной пластинки* (Mc Mahan, Slater, 1984; Карлсон, 1986; Anderson, 1986). Память надклеточных комплексов исследована и опытами с трансплантацией участка, несущего позиционную информацию о паттерне строения конечности аксолотля. Позиционная *память оказалась очень стойкой, сохраняясь при серийных гетеротопических* трансплантациях (Slack, 1983). При бесполом размножении

позиционная память надклеточных ансамблей проявляется в наследовании осевого паттерна материнского организма. Итак, после установления интегрального порядка надклеточных ансамблей этот интегральный порядок оказывается устойчивым, обладающим памятью.

Сопряженность специфической цитодифференциации и возникновения – путем слияния одноядерных клеток – надклеточной, синцитиальной или симпластической организации проявляется в преемственности паттернов пространственного расположения одноядерных клеток первичной мезенхимы и синцитиальных *спикулогенных* ансамблей. Эти паттерны затем, в процессе биоминерализации, запечатлеваются в морфологии спикул, по которой можно ретроспективно судить и об общих чертах морфологии спикулогенных ансамблей (см. гл. III).

Сопряженность миогенеза со слиянием *миобластов в миосимпласты* подобным же образом проявляется в преемственности последовательных паттернов пространственного расположения одноядерных клеток и миосимпластов, которые затем фиксируются, запечатлеваясь в морфологии миотуб (см. гл. IV).

Таким образом, эпигенетическая память клеток и их комплексов может быть кратковременной, долговременной или же практически необратимой, аналогичной импринтингу (Исаева, 1990а; Исаева, Преснов, 1990а). Следует напомнить, что применительно к *клетке импринтингом* уже названо устойчиво наследуемое при клеточной репродукции изменение чувствительности к гормону или лектину после однократной обработки им (см.: Csaba, Bohdanezky, 1984; Csaba, 1985; Kovacs et al., 1992). Геномный импринтинг же – *устойчивая модификация материнской или* отцовской генетической информации, возможно обусловленная метилированием ДНК (см.: Monk, 1985; Sapienza et al., 1989). И рецепция клеткой сигналов, и запоминание, и переработка информации осуществляются на различных *субклеточных уровнях, из которых весьма условно можно* выделить такие комплексные системы, как клеточная поверхность – цитоплазма, ядерная оболочка – ядерный матрикс, хроматин. Эпигенетические изменения, возникающие в ходе развития и цитодифференциации *на уровне ДНК (геномные перестройки, модификация оснований)*, как и изменения набора ассоциированных с ДНК белков, других компонентов хроматина и ядерного матрикса, должно быть, вносят очень существенный вклад в создание и поддержание дифференцированного *состояния соматических клеток. Конечное состояние* цитодифференциации – итог каскада взаимодействий генома и его ядерного, цитоплазматического и внеклеточного окружения.

Импринтинг в нейрофизиологии и этологии рассматривается как форма *научения, не зависящая от подкрепления*, быстро возникающая в определенный критический период развития и, как правило, не исчезающая. Импринтинг тесно связан с процессами развития и, возможно, имеет общие с ними черты (Кэндел, 1980). Все основные события проэмбрионального *и раннего эмбрионального развития* тоже однократны и необратимы, подобно импринтингу – научению. Как и в последнем случае, импринтинг яйца и зиготы можно экспериментально нарушить

воздействиями в соответствующий критический период (например, путем инверсии яиц амфибий), но едва ли переопределить после установления. При этом эпигенетическая память клеток, включая импринтинг яйца и зиготы (подобно импринтингу в этологии), – не хранение застывшего паттерна, *а его наложение, влияние на последующие паттерны.*

Итак, эпигенетическая память, преемственность и смена носителей позиционной информации в ходе развития обеспечивают как поддержание основных черт предсуществовавшего паттерна (прежде всего осевого), так и пространственно-временное развертывание вновь возникающих паттернов. Эпигенетическая память клеток может быть кратковременной, вовлекаемой в обратимый физиологический ответ соматических клеток, долговременной и характерной для яйцевых клеток практически необратимой, подобной импринтингу. Рассмотренные данные свидетельствуют о способности клеток воспринимать, хранить и перерабатывать позиционную информацию. Переработка информации осуществляется при общей для яиц, бластомеров и соматических клеток интегральной реакции поляризации, ведущую роль в которой играет перестройка цитоскелетно-мембранного комплекса. Хранение же существенной для морфогенеза информации обеспечивается стабилизацией цитоскелетно-мембранного комплекса (связывающего все субклеточные структуры) и отдельных макромолекулярных ансамблей.

ЛИТЕРАТУРА

Александрова А.Ю., Васильев Ю.М., Самойлов В.И. Контактные взаимодействия распластывающихся тромбоцитов // Цитология. 1986. Т. 28, № 11. С. 1240–1245.

Ашмарин И.П. Загадки и откровения биохимии памяти. Л.: Изд-во ЛГУ, 1975. 158 с.

Белинцев Б.Н. Физические основы биологического формообразования. М.: Наука, 1991. 254 с.

Белинцев Б.Н., Белоусов Л.В., Зарайский А.Г. Модель эпителиальных морфогенезов на основе упругих сил и контактной поляризации клеток // Онтогенез. 1985. Т. 16, № 1. С. 5–14.

Белоусов Л.В. Биологический морфогенез. М.: Изд-во МГУ, 1987.

Белоусов Л.В., Лучинская Н.Н. Исследования эстафетных межклеточных взаимодействий в эксплантатах эмбриональных тканей амфибий. 1. Эстафетные межклеточные взаимодействия при нормальном морфогенезе эксплантанта // Цитология. 1983. Т. 25. С. 939–944.

Белоусов Л.В., Мещеряков В.Н. О работах группы формообразовательных процессов кафедры эмбриологии биологического факультета МГУ // Онтогенез. 1986. Т. 17, № 3. С. 326–332.

Божкова В.П. Неоднородность клеточной поверхности как фактор морфогенеза ранних зародышей // Теоретические и математические аспекты морфогенеза / Под. ред. Е.В. Преснова и др. М.: Наука, 1987. С. 71–86.

Божкова В.П., Исаева В.В. Нарушение межклеточных взаимодействий у зародышей морского ежа додецилсульфатом натрия // Онтогенез. 1984. Т. 15, № 5. С. 465–471.

Боннер Дж. Молекулярная биология развития. М.: Мир, 1967.

Бузников Г.А. Нейротрансмиттеры в эмбриогенезе. М.: Наука, 1987. 232 с.

Бузников Г.А., Подмарев В.К. Морские ежи // Объекты биологии развития. М.: Наука, 1975. С. 188–216.

Васильев Ю.М., Гельфанд И.М. Взаимодействие нормальных и неопластических клеток со средой. М.: Наука, 1981. 220 с.

Васильев Ю.М., Гельфанд И.М., Марголис Л.Б., Самойлов В.И. Количественная оценка ориентации клеточных ядер в культуре // Онтогенез. 1971. Т. 2, № 2. С. 138–144.

Васильев Ю.М., Гельфанд И.М., Иванова О.Ю. Марголис Л.Б. Ориентация борозды деления культивируемых клеток // ДАН СССР. 1974. Т. 214, № 3. С. 685–686.

Васильев Ю.М., Гельфанд И.М., Марголис Л.Б., Самойлов В.И. Методика измерения ориентации клетки // Онтогенез. 1975. Т. 6, № 1. С. 105–110.

Вахтин Ю.Б. Генетика соматических клеток. Л.: Наука, 1974. 104 с.

Вахтин Ю.Б., Швембергер И.Н. Злокачественные миобласты скелетных мышц // Проблемы миогенеза. Л.: Наука, 1981. С. 220–244.

Вильсон Э. Клетка. М.; Л.: Биомедгиз. Т. 1. 1936; Т. 2. 1940. 1062 с.

Гагинская Е.Р., Касьянов В.Л., Корниенко Е.С. Особенности оогенеза дальневосточной морской звезды // Цитология. 1983. Т. 25, № 2. С. 135–140.

Горышина Е.Н., Чага О.Ю. Сравнительная гистология тканей внутренней среды с основами иммунологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1990. 319 с.

Гуреева М.А. Об аналогичных перестройках осевых отношений в дроблении яиц у скребней, усоногих и погонофор // Цитология. 1986. Т. 28, № 10. С. 1130–1131.

Давыдов А.С. Солитоны в биоэнергетике. Киев: Наук. думка, 1986. 159 с.
Дроздов А.Л., Исаева В.В., Подгорная О.И. Кортикальный цитоскелет оплодотворенных и неоплодотворенных яиц морского ежа // Цитология. 1987. Т. 29, № 3. С. 257–272.
Дэвидсон Э. Действие генов в раннем развитии. М.: Мир, 1972.
Елисеев Е.Н. Структура развития сложных систем. Л.: Наука, 1983. 263 с.
Заварзин А.А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани // Избр. тр. М.; Л.: Изд-во АН СССР, 1953, Т. 4. С. 115–131.
Заварзин А.А. Развитие теории параллелизма на примере работ кафедры цитологии и гистологии ЛГУ // Проблемы развития морфологии животных. М.: Наука, 1982. С. 75–89.
Заварзин А.А. Основы сравнительной гистологии. Л.: Изд-во ЛГУ, 1985. 400 с.
Иванов П.П. Общая и сравнительная эмбриология. М.; Л.: ОГИЗ–Биомедгиз, 1937. 809 с.
Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных: Простейшие и низшие многоклеточные. Новосибирск: Наука, 1975.
Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных: Трохофорные, щупальцевые, щепинкочелюстные, погонофоры. М.: Наука, 1977.
Иванова-Казас О.М. Сравнительная эмбриология беспозвоночных животных: Иглокожие и полухордовые. М.: Наука, 1978. 167 с.
Исаева В.В. Модуляция фенотипа мышечных клеток куриного зародыша в суспензионной культуре // Онтогенез. 1979. Т. 10. С. 616–621.
Исаева В.В. Дифференциация клеток бластулы морского ежа Strongylocentrotus nudus в однослойной культуре // Биология моря. 1980а. № 2. С. 52–56.
Исаева В.В. Контактная ориентация миобластов и мышечных волокон в дифференцирующейся культуре миогенных клеток // Онтогенез. 1980б. Т. 11, № 2. С. 168–173.
Исаева В.В. Радиализация личиночного скелета у эмбрионов морского ежа Strongylocentrotus nudus, обработанных папаином // Там же. 1981а. Т. 12, № 6. С. 639–643.
Исаева В.В. Спикулогенез в культуре клеток бластулы морского ежа // Цитология. 1981б. Т. 23, № 6. С. 707–710.
Исаева В.В. Сохранение биполярной формы и контактной ориентации митотически делящимися миобластами куриного эмбриона в однослойной культуре // Там же. 1981в. Т. 23. № 5. С. 559–563.
Исаева В.В. О морфогенетической роли кортикального цитоскелета и плазматической мембраны яйцеклетки // Там же. 1984. Т. 26, № 1. С. 5–13.
Исаева В.В. Эпигенетическая память цитоплазмы: Яйцо, бластомеры, соматические клетки // Аналитические аспекты дифференцировки / Под ред. Е.В. Преснова и др. М.: Наука, 1990а.
Исаева В.В. Нарушения поляризации зигот бурой водоросли Pelvetia wrightii: Эффект цитохалазина // Онтогенез. 1990б. Т. 21, № 4. С. 422–428.
Исаева В.В., Керкис А.Ю. Влияние прикрепления к твердому субстрату на структурную организацию скелетно-мышечных симпластов // Цитология. 1988. Т. 30. № 1. С. 44–48.
Исаева В.В., Коренбаум Е.С. Защитные функции целомоцитов и иммунитет иглокожих // Биология моря. 1989. № 6. С. 3–14.
Исаева В.В., Подгорная О.И. Поведение гемоцитов гребешка Patinopecten yessoensis в первичной культуре // Цитология. 1984. Т. 26, № 10. С. 1151–1155.
Исаева В.В., Преснов Е.В. Стабилизация после оплодотворения и поддержание в ходе дробления экспериментально измененной формы яйцеклеток морского ежа // Там же. 1983. Т. 25, № 2. С. 200–203.
Исаева В.В., Преснов Е.В. Пространственная организация клетки и морфогенез // Теоретические и математические аспекты морфогенеза. М.: Наука, 1987. С. 48–71.
Исаева В.В., Преснов Е.В. Топологическое строение морфогенетических полей. М.: Наука. 1990а. 256 с.

Исаева В.В., Преснов Е.В. Поляризованное распределение фибриллярного актина в ооцитах некоторых иглокожих // Цитология. 1990б. Т. 32, № 2. С. 117–121.
Исаева В.В., Чуриков Д.Ю. Активация и амебоидная подвижность яиц морского ежа, вызванные воздействием цитохалазина // Онтогенез. 1988а. Т. 19. № 13. С. 288–295.
Исаева В.В., Чуриков Д.Ю. Влияние цитохалазина и колхицина на морфологическую экспрессию спикулогенеза в дифференцирующейся культуре клеток эмбрионов морского ежа // Там же. 1988б. Т. 19, № 6. С. 626–634.
Карлсон Б.М. Регенерация. М.: Наука, 1986. 296 с.
Касьянов В.Л. Репродуктивная стратегия морских двустворчатых моллюсков и иглокожих. Л.: Наука, 1989. 183 с.
Керкис А.Ю., Исаева В.В. Обратимое подавление экспрессии мышечной дифференциации в однослойной культуре // Цитология. 1981а. Т. 23, № 3. С. 328–332.
Керкис А.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование миогенных клеток куриного эмбриона в суспензионной культуре // Отногенез. 1981б. Т. 12, № 6. С. 555–563.
Керкис А.Ю., Исаева В.В. Особенности проявления морфологических признаков дифференцировки в суспензионной культуре миогенных клеток // Цитология. 1983. Т. 25, № 12. С. 1411–1415.
Керкис А.Ю., Исаева В.В. Электронно-микроскопическое исследование спикулогенеза в культуре эмбриональных клеток морского ежа // Онтогенез. 1984. Т. 15, № 1. С. 34–40.
Коренбаум Е.С., Воробьев В.А. Клетки целомической жидкости морской звезды Asterias amurensis // Биология моря. 1988. № 1. С. 27–33.
Купер Э. Сравнительная иммунология. М.: Мир, 1980. 422 с.
Кэндел Э. Клеточные основы поведения. М.: Мир, 1980. 598 с.
Лучинская Н.Н., Белоусов Л.В. Электронно-микроскопическое исследование быстрых морфогенетических процессов в эксплантатах эмбриональных тканей амфибий // Онтогенез. 1977. Т. 3, № 3. С. 263–268.
Ляпунов А.А. Кибернетический подход к теоретической биологии // Кибернетика живого: Биология и информация. М.: Наука, 1984. С. 38–45.
Малахов В.В. Эмбриональное развитие свободно-живущих морских нематод из отрядов Chromatodorida и Desmodorida // Зоол. журн. 1981. Т. 60, № 4. С. 485–495.
Малахов В.В., Черданцев В.Г. Эмбриональное развитие свободноживущей морской нематоды Pontonema vulgare // Там же. 1975. Т. 54. № 2. С. 165–174.
Мещеряков В.Н., Белоусов Л.В. Изменение пространственной организации раннего дробления моллюсков Lymnaea stagnalis и Physa fontinalis при действии трипсина Онтогенез. 1973. Т. 4, Т. 4. С. 359–372.
Мещеряков В.Н., Белоусов Л.В. Пространственная организация дробления // Итоги науки и техники. Морфология человека и животных. М.: ВИНИТИ, 1978. Т. 8. С. 3–100.
Нейфах А.А., Лозовская Е.Р. Гены и развитие организма. М.: Наука, 1984. 191 с.
Подгорная О.И., Исаева В.В. Тромбообразовательная функция клеток-морул целомической жидкости морского ежа // Биология моря. 1985. № 5. С. 26–31.
Потапова О.О., Бейлина С.И., Заикин А.Н. Определение количественных характеристик автоволновых режимов структурирования в тонком слое клеток // Теоретические и математические аспекты морфогенеза / Под ред. Е.В. Преснова и др. М.: Наука, 1987. С. 86–95.
Преснов Е.В., Исаева В.В. Перестройки пространственной организации раннего дробления морского ежа в капилляре // Онтогенез. 1982. Т. 13, № 3. С. 323–332.
Преснов Е.В., Исаева В.В. Перестройки пространственной организации дробления уплощенных временным сдавливанием зигот морского ежа // Там же. 1983. Т. 14, № 3. С. 319–324.
Преснов Е.В., Исаева В.В. Перестройки топологии при морфогенезе. М.: Наука, 1985. 192 с.

Преснов Е.В., Исаева В.В. Морфогенетические поля // Теоретические и математические аспекты морфогенеза / Под ред. Е.В. Преснова и др. М.: Наука, 1987. С. 208–217.

Равен Х. Оогенез: Накопление морфогенетической информации. М.: Мир, 1964. 304 с.

Рингерц Н., Сэвидж Р. Гибридные клетки. М.: Мир, 1974. 415 с.

Ровенский Ю.А. Растровая электронная микроскопия нормальных и опухолевых клеток. М.: Медицина, 1979. 150 с.

Ровенский Ю.А., Славная И.Л., Васильев Ю.И. Исследование реакций нормальных фибробластоподобных клеток и фибробластов линии L на упорядоченный рельеф подложки // Цитология. 1971. Т. 13, № 5. С. 574–583.

Румянцев П.П. Морфология миоцитов сердца в различные периоды нормального и "реактивного" митотического цикла по данным электронной микроскопии и субмикроскопической авторадиографии // Арх. анатомии, гистологии и эмбриологии. 1973. Т. 65, № 7. С. 15–21.

Румянцев П.П. Закономерности основных типов миогенеза в свете данных электронно-микроскопической авторадиографии // Системные свойства тканевых организаций. М.: Наука, 1977. С. 197–198.

Румянцев П.П., Ерохина И.Л. Морфологические аспекты дифференцировки и пролиферации в гистогенезе скелетных, сердечной и гладких мышц позвоночных // Проблемы миогенеза / Под ред. Г.П. Пинаева, В.Б. Ушакова. Л.: Наука, 1981. С. 22–50.

Рябова Л.В., Бетина М.И., Васецкий С.Г. Участие микрофиламетов в созревании ооцитов шпорцевой лягушки // ДАН СССР. 1984. Т. 277, № 3. С. 704–706.

Самойлов В.И. Словачевский М.С., Ровенский Ю.А., Славная И.Л. Форма и ориентация ядер эмбриональных фибробластоподобных клеток на подложках с упорядоченным рельефом // Цитология. 1975. Т. 17, № 4. С. 453–457.

Славная И.Л., Ровенский Ю.А., Смурова Е.В., Новикова С.П. Культивирование нормальных и малигнизированных фибробластоподобных клеток на подложках с упорядоченным рельефом // Там же. 1974. Т. 16, № 10. С. 1296–1300.

Уоддингтон К. Морфогенез и генетика. М.: Мир, 1964. 259 с.

Фонталин Л.Н. Проблема происхождения иммунной системы позвоночных животных // Иммунология. 1988. № 3. С. 5–20.

Фридлянская И.И. Использование клеточных культур для изучения миогенеза // Проблемы миогенеза. Л.: Наука, 1981. С. 188–208.

Хэм А., Кормак Д. Гистология. М.: Мир, 1983. Т. 2. 256 с.

Шаскольская М.П. Кристаллография. М.: Высш. шк., 1976. 391 с.

Шмидт-Ниельсен К. Физиология животных: Приспособление и среда. М.: Мир, 1982. Т. 1. 416 с.

Abbott J., Schiltz J., Dienstman S., Holtzer H. The phenotypic complexity of myogenic clones // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1974. Vol. 71, N 4. P. 1506–1510.

Abercrombie M. Concepts in morphogenesis // Proc. Roy. Soc. London B. 1977. Vol. 199. P. 337–344.

Adamo S., Molinaro M. Expression of differentiative traits in the absence of cell fusion during myogenesis in culture // Cell Differ. 1976. Vol. 5, N 1. P. 53–67.

Adams D.S. Mechanisms of cell shape change: The cytomechanics of cellular response to chemical environment and mechanical loading // J. Cell Biol. 1992. Vol. 117, N 1. P. 83–93.

Adelson D.L., Humphreys T. Sea urchin morphogenesis and cell-hyalin adhesion are perturbed by a monoclonal antibody specific for hyalin // Development. 1988. Vol. 104, N 3. P. 391–402.

Albrecht-Buehler G. Is cytoplasm intelligent too? // Cell and muscle motility. N.Y. etc.: Plenum press, 1985a. Vol. 6. P. 1–21.

Albrecht-Buehler G. The interpretation of cell movement: A paradox of cell biochemistry // Exp. Biol. and Med. 1985b. Vol. 10. P. 119–129.

Alliegro M.C., McClay D.R. Storage and mobilization of extracellular matrix proteins during sea urchin development // Develop. Biol. 1988. Vol. 125, N 1. P. 208–216.

Almers W., Stirling C. Distribution on transport proteins over animal cell membranes // J. Membrane Biol. 1984. Vol. 77, N 3. P. 169–186.

Amemiya S. Development of the basal lamina and its role in migration and pattern formation of primary mesenchyme cells in sea *urchin embryos* // Develop., Growth and Differ. 1989. Vol. 31, N 2. P. 131–145.

Amemiya S., Akasaka K. Scanning electron microscopical observations of the morphogenetic processes of primary mesenchyme cells in developing sea urchin (Anthocidaris crassispina) embryos // J. Fac. Sci. Univ. Tokyo. Ser. 4. 1986. Vol. 16, N 2. P. 111–119.

Anderson C.H., Grines S. Cartilage induction in vitro: Ultrastructural studies // Develop. Biol. 1977. Vol. 60, N 2. P. 351–358.

Anderson M.J. Nerve-induced remodelling in muscle basal lamina during synaptogenesis // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102, N 3. P. 863–877.

Andrew W. Comparative hematology. N.Y.; L.: Grune and Stration, 1965. 188 p.

Angerer R.C., Davidson E.H. Molecular indices of cell lineage *specification in sea urchin* embryos // Science. 1984. Vol. 226, N 4679. P. 1153–1160.

Anstrom J.A., Chin J.E., Leaf D.S., Parks A.L., Raff R.A. Localization and expression of msp 130, a primary mesenchime lineage-specific cell surface protein of the sea urchin embyo // Development. 1987. Vol. 101, N 2. P. 255–265.

Antin P.B., Tokunaka S., Machmias V.T., Holtzer H. Role of stress fiber-like structures in assembling nascent myofibrils in myosheets recovering from exposure to ethyl methanesulfonate // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102, N 4. P. 1464–1479.

Arnolds W.J.A., Van der Biggelaar J.A.M., Verdonk N.H. Spatial aspects of cell interactions involved in the determination of dorsoventral polarity in equally cleaving gastropods and regulative abilities of their embryos as studied by micromere deletions in Lymnaea and Patella // W. Roux' Arch. Develop. Biol. 1983. Vol. 192, N 1. P. 75–85.

Aubin J.E., Weber K., Osborn M. Analysis of actin and microfilament-assoiated proteins in the mitotic spindle and cleavage furrow of PtK_2 cells by immunofluorescence microscopy // Exp. Cell Res. 1979. Vol. 124, N 1. P. 93–109.

Azzolina L.S., De Muri C., Prati G., Robotti M. Phylogenesis of immunocompeteni cells // Bull. Zool. 1985. Vol. 52, N 3/4. P. 167–187.

Bailly E., Celati C., Bornens M. The cortical actomyosin system of cytochalasin D-treated lymphoblasts // Exp. Cell Res. 1991. Vol. 196. P. 287–293.

Bang E.B. Phagocytosis in invertebrates // Invertebrate immunity: Mechanisms of invertebrate vector-parasite relations. N.Y. etc.: Acad. press, 1975. P. 137–151.

Banzhaf W.C., Warren R., McClay D.R. Cortical reorganization following fertilization of sea urchin eggs: Sensitivity to cytochalasin B // Develop. Biol. 1980. Vol. 80, N 2. P. 506–515.

Barriere H., Chambard M., Mauchamp J., Gabrion J. Polarity reversal of inside-out thyroid follicles cultured within collagen gel: An ultrastructural study // Biol. Cell. 1986. Vol. 57, N 1. P. 39–52.

Bayne C.J. Gastropod cells in vitro // Advances in cell culture. N.Y. etc.: Acad. press, 1981. Vol. 1. P. 297–334.

Bechem M., Pieper F., Pott L. Guinea pig atrial cardioballs // Basic Res. Cardiol. 1985. Vol. 80, suppl. 1. P. 19–22.

Begg D.A., Rebhun L.J. pH regulates the polymerization of actin in the sea urchin egg cortex // J. Cell Biol. 1979. Vol. 83. P. 241–248.

Begg D.A., Salmon E.D., Hyatt H.A. The changes in response to hydrostatic pressure // Ibid. 1973. Vol. 97, N 6. P. 1795–1805.

Bennett G.S., Fellini S.A., Toyama Y., Holtzer H. Redistribution of intermediate filament subunits during skeletal myogenesis and maturation in vitro // Ibid. 1979. Vol. 82. P. 577–584.

Benson S.C., Benson N.C., Wilt F. The organic matrix of the skeletal spicule of sea urchin embryos // Ibid. 1986. Vol. 102. P. 1878–1886.

Benson S., Smith L., Wilt F., Shaw R. The synthesis and secretion of collagen by cultured sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1990. Vol. 188. P. 141–146.

Benson S., Sucov H., Stephens L., Davidson E., Wilt F. A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule. 1. Autentication of the cloned gene and its developmental expression // Develop. Biol. 1987. Vol. 120, N 2. P. 499–506.

Bentrup F.-W. Cellular polarity // Cellular interaction. B. etc.: Springer, 1984. P. 437–490.

Berlin R.D., Oliver J.M. The movement of bound ligands over cell surfaces // J. Theor. Biol. 1982. Vol. 99, N 1. P. 69–80.

Berry S.J. RNA synthesis and storage during insect oogenesis // Developmental Biology. N.Y.: Plenum press, 1985. Vol. 1. P. 351–384.

Bertheussen K., Seljelid R. Echinoid phagocytes in vitro // Exp. Cell Res. 1978. Vol. 111. P. 401–412.

Biggelaar J.A.M. van den, Kühtreiber W.M., Serras F., Dorresteijn A., Beekhuizen H., Schaap D. Analysis of cell communication mechanisms involved in the induction of the stem cells of the mesodermal bands in embryos of Patella vulgata (Mollusca) // Acta histochem. 1986. Suppl.-Bd. 32. S. 29–33.

Birk D.E., Trelstad R.L. Metazoan mesenchyme partitions the extracellular space during matrix morphogenesis // Biology of invertebrate and lower vertebrate collagens. N.Y.: Plenum press, 1985. P. 103–114.

Bishoff R., Holtzer H. Effect of colchicine on myogenesis in vitro // J. Cell Biol. 1967. Vol. 35, N 2, pt. 2. P. 14a.

Bishoff R., Holtzer H. Mitosis and the processes of differention of myogenic cells in vitro // Ibid. 1969. Vol. 41. P. 188–200.

Bishoff R., Holtzer H. Inhibition of myoblast fusion after one round of DNA synthesis in 5-bromodeoxyuridine // Ibid. 1970. Vol. 5, N 1. P. 134–150.

Bissell M.J., Barcelos-Hoff H. The influence of extracellular matrix on gene expression: Is structure the message? // J. Cell Sci. 1987. Suppl. 8. P. 327–343.

Bissell M.J., Hall H.G., Parry C. How does the extracellular matrix direct gene expression? // J. Theor. Biol. 1982. Vol. 99, N 1. P. 31–68.

Black S.D., Gerhart J.C. High-frequency twinning of Xenopus laevis embryos from eggs centrifugated before first cleavage // Develop. Biol. 1986. Vol. 116, N 1. P. 228–240.

Blankenship J., Benson S. Collagen metabolism and spicule formation in sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1984. Vol. 152, N 1. P. 98–104.

Blau H.M. Hierarchies of regulatory genes may specify mammalian development // Cell. 1988. Vol. 53. P. 673–674.

Bliokh Z.L., Domnina L.V., Ivanova O.Y. et al. Spreading of fibroblasts in medium containing cytochalasin B: Formation of lamellar cytoplasm in combination of several functionally different processes // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1980. Vol. 77. P. 5919–5922.

Bloch R.J. Clusters of neural cell adhesion molecule at sites of cell-cell contact // J. Cell Biol. 1992. Vol. 116, N 2. P. 449–463.

Bohn H. Hemolymph clotting in insects // Invertebrate immunity mechanisms of invertebrate vector-parasite relations. N.Y. etc.: Acad. press, 1975. P. 188–207.

Bonder E.M., Mooseker M.S. Cytochalasin B slows but does not prevent monomer addition at the barded end of the actin filament // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102, N 1. P. 282–288.

Boolootian R.A., Giese A.G. Clotting of echinoderm coelomic fluid // J. Exp. Zool. 1959. Vol. 140. P. 207–229.

Bornens M., Paintrand M., Celati C. The cortical microfilament system of lymphoblasts displays a periodic oscillatory activity in the absence of microtubules: Implications for cell polarity // J. Cell Biol. 1989. Vol. 109. P. 1071–1083.

Boucaut J.-C., Darribere T., Shi D.L., Riou J.-F., Johnson K.E., Delarue M. Amphibian gastrulation: the molecular basis of mesodermal cell migration in urodele embryos // Gastrulation. N.Y.: Plenum press, 1991. P. 169–184.

Bourguignon L.Y.W., Bourguignon G.J. Capping and the cytoskeleton // Intern. Rev. Cytol. 1984. Vol. 87. P. 195–223.

Boyle J.A., Ernst S.G. Sea urchin oocytes possess elaborate cortical arrays of microfilaments, microtubules and intermediate filaments // Develop. Biol. 1989. Vol. 134, N 1. P. 72–84.

Brawley S.H. A sodium-dependent, fast block to polyspermy occurs in eggs of fucoid algae // Ibid. 1987. Vol. 124, N 2. P. 390–397.

Brawley S.H., Quatrano R.S. Sulfation of fucoidin in Fucus embryos. 4. Autoradiographic investigations of fucoidin sulfation and secretion during differentiation and the effect of cytochalasin treatment // Ibid. 1979. Vol. 73, N 2. P. 193–205.

Brawley S.H., Robinson K.R. Cytochalasin treatment distrupt the endogenous currents associated with cell polarization in fucoid zygotes: Studies of the role of F-actin in embryogenesis // J. Cell Biol. 1985. Vol. 100, N 4. P. 1173–1184.

Brett J.G., Godman G.C. Cytoskeletal organization affects cellular responses to cytochalasins: Comparison of a normal line and its transformant // Tissue and Cell. 1986. Vol. 18, N 2. P. 175–199.

Brewster F., Nicholson B.L. In vitro maintenance of amoebocytes from the american oyster (Crassostrea virginica) // J. Fish. Res. Board Canada. 1979. Vol. 36. p. 461–467.

Britland S., Clark P., Connolly P., Moores G. Micropatterned substratum adhesiveness: A model for morphogenetic cues controlling cell behavior // Exp. Cell Res. 1992. Vol. 198. P. 124–129.

Brunette D.M. Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions // Ibid. 1986a. Vol. 164, N 1. P. 11–26.

Brunette D.M. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata // Ibid. 1986b. Vol. 167. P. 203–217.

Bryan J. Redistribution of actin and fascin during fertilization in sea urchin eggs // Cell Differ. 1982. Vol. 11. P. 279–280.

Burdsal C.A., Alliegro M.C., McClay D.R. Tissue-specific, temporal changes in cell adhesion to echinonectin in the sea urchin embryo // Develop. Biol. 1991. Vol. 144. P. 327–334.

Burridge K. Substrate adhesion in normal and transformed fibroblasts: Organization and regulation of cytoskeletal, membrane and extracellular matrix components at focal contacts // Cancer Res. 1986. Vol. 4. P. 18–78.

Burridge K., Monoly L., Kelly T. Adhesion plaques: Sites of transmembrane interactions between the extracellular matrix and the actin cytoskeleton // J. Cell Sci. 1987. Suppl. 8. P. 211–229.

Busa W.B., Ferquson J.E., Joseph S.K., Williamson J.R., Nuccitelli R. Activation of frog (Xenopus laevis) eggs by inositol triphosphate. 1. Characterization of Ca^{2+} release from intracellular stores // J. Cell Biol. 1985. Vol. 101. P. 677–682.

Busa W.B., Nuccitelli R. An elevated free cytosolic Ca^{2+} wave follows fertilization in egg of the frog Xenopus laevis // J. Cell Biol. 1985. Vol. 100, N 4. P. 1325–1329.

Buznikov G.A. The action of neurotransmitters and related substances on early embryogenesis // Pharmacol. Ther. 1984. Vol. 25. P. 23–59.

Buznikov G.A., Shmukler Yu.B. Possible role of "prenervous" neurotransmitters in cellular interactions of early embryogenesis: A hypothesis // Neurochem. Res. 1981. Vol. 6. P. 55–68.

Callaini G. Microtubule distribution reveals superficial metameric patterns in the early Drosophila embryo // Development. 1989. Vol. 107. P. 35–41.

Cameron R.A., Davidson E.H. Cell type specification during sea urchin development // Trends Genet. 1991. Vol. 7, N 7. P. 212–218.

Cameron R.A., Traser S.E., Britten R.J., Davidson E.H. The oral-aboral axis of a sea urchin embryo is specified by first cleavage // Development. 1989. Vol. 106. P. 641–647.

Cameron R.A., Fraser S.E., Britten R.J., Davidson E.H. Segregation of oral from aboral

ectoderm precursors is completed at fifth cleavage in the embyogenesis of Strongylocentrotus purpuratus // Develop. Biol. 1990. Vol. 137, N 1. P. 77–85.
Campion D.R. The muscle satellite cell: A review // Intern. Rev. Cytol. 1984. Vol. 87. P. 225–251.
Canicatti C. Cellular and molecular basis of encapsulation in sea cucumber host // Echinoderm research, 1991. Rotterdam: Balkema, 1992. P. 209–218.
Canicatti C., Götz P. DOPA oxidation by Holothuria polii coelomocyte lysate // J. Invertebrate Pathol. 1991. Vol. 58. P. 305–310.
Cano M.L., Cassimeris L., Joyce M., Zigmond S.H. Characterization of tetramethylrhodaminyl-phalloidin binding to cellular F-actin // Cell Motil. Cytoskel. 1992. Vol. 21. P. 147–158.
Carrino D., Gerschman H. Division of BALB/c mouse 3T3 and simian virus 40 – transformed 3T3 cell in cellular aggregates // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1977. Vol. 74. P. 3874–3878.
Carroll A.G., Eckberg W.R. Inhibition of germinal vesicle breakdown and activation of cytoplasmic contractility in Spisula oocytes by calmodulin antagonists // Biol. Bull. 1986. Vol. 170, N 1. P. 43–50.
Carson D.D., Farach M.C., Earles D.S., Decker G.L., Lennarz W.J. A monoclonal antibody inhibits calcium accumulation and skeleton formation in cultured embryonic cells of the sea urchin // Cell. 1985. Vol. 41. P. 639–648.
Carter S.B. Haplotaxis and the mechanism of cell motility // Nature. 1967. Vol. 213. P. 256–261.
Cassella G.I., Flanagan M.D., Lin S. Cytochalasin B inhibits actin polymerization and induces depolymeriation of actin filaments formed during platelet shape change // Ibid. 1981. Vol. 293. P. 302–305.
Casella J.I., Flanagan M.D., Lin S. Cytochalasins: Their use as tools in the investigation of actin polymerization in vivo and in vitro // Actin structure and function in muscle and non-muscle cells. Sydney etc.: Acad. press, 1983. P. 227–240.
Cerny L.C., Bandman E. Contractile activity is required for the expression of neonatal myosin heavy chain in embryonic chick pectoral muscle cultures // J. Cell Biol. 1986. Vol. 103, N 6, pt 1. P. 2153–2161.
Chambard M., Gabrion J., Mauchamp J. Influence of collagen gel on the orientation of epithelial cell polarity: Follicle formation from isolated thyroid cells and from preformed monolayers // Ibid. 1981. Vol. 91, N 1. P. 157–166.
Chamberlain J. Protein synthesis by separated blastomeres of sixteen-cell sea urchin embryos // Ibid. 1977. Vol. 75, N 2, pt 2. P. 33a.
Chandebois R., Faber J. Automation of animal development: A new theory derived from the concept of cell sociology. Basel etc.: Karger, 1983. 204 p.
Chandler D.E. Exocytosis in vitro: Ultrastructure of the isolated sea urchin egg cortex as seen in platinum replica // J. Ultrastuct. Res. 1984. Vol. 89. P. 198–211.
Cheer A., Vincent J.-P., Nuccitelli R., Oster G. Cortical activity in vertebrate eggs. 1. The activation waves // J. Theor. Biol. 1987. Vol. 124, N 4. P. 377–404.
Chen J., Stuckey E.C., Berry C.L. Three-dimensional culture of rat exocrine pancreatic cells using collagen gels // Brit. J. Exp. Pathol. 1985. Vol. 66. P. 551–559.
Chen Y.P., Solursh M. The determination of myogenic and cartilage cells in the early chick embryo and the modifying effect of retinoic acid // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1991. Vol. 200. P. 162–171.
Chien P.K., Johnson P.T., Holland N.D., Chapman F.A. The coelomic elements of sea urchin (Strongylocentrotus). 4. Ultrastructure of the coelomocytes // Protoplasma. 1970. Vol. 71. P. 419–442.
Child C.M. Patterns and problems of development. Chicago: Univ. press, 1941. 811 p.
Chow I., Poo M.M. Redistribution of cell surface receptors induced by cell–cell contact // J. Cell Biol. 1982. Vol. 95, N 2. P. 510–518.
Christensen K., Merriam R.W. Insensitivity to cytochalasin B of surface contractions

keyed to cleavage in the Xenopus egg // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1982. Vol. 72. P. 143–151.
Christensen K., Sauterer R., Merriam R.W. Role of soluble myosin in cortical contractions of Xenopus eggs // Nature. 1984. Vol. 310, N 5973. P. 150–151.
Clark P., Connolly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W. Topographical control of cell behaviour. 1. Simple step cues // Development. 1987. Vol. 99. P. 439–448.
Clark P., Connolly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W. Topographical control of cell behaviour. 2. Multiple grooved substrata // Ibid. 1990. Vol. 108. P. 635–644.
Clark P., Connolly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W. Cell guidance by ultrafine topography in vitro // J. Cell Sci. 1991. Vol. 99, pt 1. P. 73–77.
Cline C.A., Schatten G. Microfilaments during sea urchin fertilization: Fluorescence detection with rhodaminyl phalloidin // Gamete Res. 1986. Vol. 14. P. 277–291.
Cline C.A., Schatten H., Balczon R., Schatten G. Actin-mediated surface motility during sea urchin fertilization // Cell Motil. 1983. Vol. 3. P. 513–524.
Coffe G., Foucault G., Soyer M.O., De Bully F., Pudles J. State of actin during the cycle of cohesiveness of the cytoplasm in parthenogenetically activated sea urchin egg // Exp. Cell Res. 1982. Vol. 142. P. 365–372.
Cohen W.D., Nemhauser I., Cohen M.F. Marginal band of lobster blood cells: Disappearance associated with changes in cell morphology // Biol. Bull. 1983. Vol. 164. P. 50–61.
Connolly J.A. Role of the cytoskeleton in the formation, stabilization and removal of acetylcholine receptor clusters in cultured muscle cells // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 1. P. 148–154.
Conrad A.H., Clark W.A., Conrad G.W. Subcellular compartmentalization of myosin isoforms in embyonic chick heart ventricle myocytes during cytokinesis // Cell Motil Cytoskel. 1991. Vol. 19. P. 189–206.
Cooke J. Dynamics of the control of body pattern in the development of Xenopus laevis. 4. Timing and pattern in the development of twinned bodies after reorientation of eggs in gravity // Development. 1987. Vol. 99. P. 417–427.
Coombe D.R., Ey P.L., Jenkin C.R. Self / non-self recognition in invertebrates // Quart. Rev. Biol. 1984. Vol. 59, N 1. P. 231–255.
Cooper A., Munden H., Brown H.L. The growth of mouse neuroblastoma cells in controlled orientation on thin films of silicon monoxide // Exp. Cell Res. 1976. Vol. 103. P. 435–438.
Cooper E.L. Comparative immunology // Amer. Zool. 1985. Vol. 25, N 3. P. 649–664.
Cooper J.A. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin // J. Cell Biol. 1987. Vol. 105, N 4. P. 1473–1478.
Cooper W.G., Konigsberg I.R. Dynamics of myogenesis in vitro // Anat. Rec. 1961. Vol. 140. P. 195–199.
Cotman C.W., Nieto-Sampedro M. Cell biology of synaptic plasticity // Science. 1984. Vol. 225, N 4668. P. 1287–1294.
Cowan A.E., McIntosh J.R. Mapping the distribution of differentiation potential for intestine, muscle, and hypodermis during early development in Caenorhabditis elegans // Cell. 1985. Vol. 41. P. 923–932.
Crick F.H.C. Linking number and nucleosomes // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1976. Vol. 75, N 8. P. 2639–2643.
Croop J., Holtzer H. Response of myogenic and fibrogenic cells to cytochalasin B and to colcemid // J. Cell Biol. 1975. Vol. 65. P. 271–285.
Crowley K.S., Brasch K. Does the interchromation compartement contain actin? // Cell Biol. Intern. Rep. 1987. Vol. 11, N 7. P. 537–546.
Csaba G. The unicellular Tetrahymena as a model cell for receptor research // Intern. Rev. Cytol. 1985. Vol. 95. P. 327–377.
Csaba G., Bohdanezky E. Induction of imprinting and "memory" in Chang liver cells with lectin // Cell. and Mol. Biol. 1984. Vol. 30, N 1. P. 1–4.
Cunha G.R., Bigsby R.M., Cooke P.S., Sugimura Y. Stromal-epithelial interactions in adult organs // Cell Differ. 1985. Vol. 17, N 3. P. 137–148.

Cunningham B.A., Hemperly J.J., Murray B.A., Prediger E.A., Brackenbury R., Edelman G.M. Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation and alternative RNA splicing // Science. 1987. Vol. 236. P. 799–806.

Curtis A.S.G., Clark P. The effects of topographic and mechanical properties of materials on cell behaviour // Crit. Rev. Biocompatibility. 1990. Vol. 5, iss. 4. P. 344–362.

Curtis A., Varde M. Control of cell behaviour: Topological factors // J. Nat. Cancer Inst. 1964. Vol. 33. P. 15–26.

Czihak G. Entwicklungsphysiologishe Untesuchungen an Echiniden (Verteilung und Bedeutung der Cytochromydase) // W. Roux' Arch. Entwicklungsmech. Organism. 1963. Bd. 154, N 3. S. 272–292.

Czihak G. (ed.). The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B. etc.: Springer, 1975. P. 177–307.

Dan K. Studies of unequal cleavage in sea urchins. 1. Migration of the nuclei to the vegetal pole // Develop., Growth and Differ. 1979. Vol. 21, N 6. P. 527–535.

Dan K. The cause and consequence of unequal cleavage in sea urchis // Zool. Sci. 1984. Vol. 1, N 2. P. 151–160.

Dan K., Ito S. Studies of unequal cleavage in molluscs. 1. Nuclear migration and anchorage of a spindle pole to cortex as revealed by isolation technique // Develop., Growth and Differ. 1984. Vol. 26, N 3. P. 249–272.

Dan-Sohkawa M. A "normal" development of denuded eggs of the starfish, Asterina pectinifera // Ibid. 1976. Vol. 18, N 4. P. 439–445.

Dan-Sohkawa M. Formation of joined larvae in the starfish, Asterina pectinifera // Ibid. 1977. Vol. 19, N 3. P. 233–239.

Dan-Sohkawa M., Fujisawa H. Cell dynamics of the blastulation process in the starfish, Asterina pectinifera // Develop. Biol. 1980. Vol. 77, N 2. P. 328–339.

Darmon M., Serrero G., Rizzino A., Sato G. Isolation of myoblastic, fibro-adipogenic, and fibroblastic clonal cell lines from a common precursor and study of their requirements for growth and differentiation // Exp. Cell Res. 1981. Vol. 132. P. 313–327.

Dartsch P.C., Hämmerle H. Orientation response of arterial smooth muscle cells to mechanical stimulation // Europ. J. Cell Biol. 1986. Vol. 41,N 2. P. 339–346.

Dartsch P.C., Hämmerle H., Betz E. Orientation of cultured arterial smooth muscle cells growing on cyclically stretched substrates // Acta anat. 1986. Vol. 125, N 2. P. 108–113.

Davidson E.H. Gene activity in early development. 3rd ed. Orlando etc.: Acad. press, 1986. 670 p.

Davidson E.H. Understanding embryonic development: A contemporary view // Amer. Zool. 1987. Vol. 27. P. 581–591.

Davidson E.H. Lineage-specific gene expression and the regulative capacities of the sea urchin embryo: A proposed mechanism // Development. 1989. Vol. 105. P. 421–445.

Davies P.S., Partridge T. Limpet haemocytes. 1. Studies on aggregation and spike formation // J. Cell Sci. 1972. Vol. 11. P. 757–770.

Debus E., Weber K., Osborn M. The cytoskeleton of blood platelet viewed by immunofluorescence microscopy // Europ. J. Cell Biol. 1981. Vol. 73. P. 45–52.

Decker G.L., Lennarz W.J. Skeletogenesis in the sea urchin embryo // Development. 1988. Vol. 103. P. 231–247.

Decker G.L., Morrill J.B., Lennarz W.J. Characterization of sea urchin primary mesenchyme cells and spicules during biomineralization in vitro // Ibid. 1987. Vol. 101, N 2. P. 297–312.

Delain D. Is fusion a trigger for myoblast differentiation? // Exp. Cell Res. 1975. Vol. 93. P. 495–498.

De Ridder C., Jangoux M. Intracoelomic parasitic Sporozoa in the burrowing spatangoid echinoid Echinocardium // Meeresuntersuch. 1984. Vol. 37. P. 225–231.

Deuchar E.M. Cellular interactions in animal development. L.: Chapman and Hall, 1975.

Dictus W.J.A., Van Zoelen B.J.J., Tetteroo P.A.T., Tertoolen L.G.J., De Laat S.W., Bluemink J.G. Lateral mobility of plasma membrane lipids in Xenopus eggs: Regional differences related to animal / vegetal polarity become extreme upon fertilization // Develop. Biol. 1984. Vol. 101, N 1. P. 201–211.

Dlugosz A.A., Antin P.B., Nachmias V.T., Holtzer H. The relationship between stress fibers and nascent myofibrils in cultured cardiac myocytes // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99. P. 2268–2778.

Dorresteijn A.W.C., Bornewasser H., Fischer A. A correlative study of experimentally changed first cleavage and Janus development in the trunk of Platynereis dumerlii (Annelida, Polychaeta) // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1987. Vol. 196, N 1. P. 51–58.

Dorresteijn A.W.C., Eich P. Experimental change of cytoplasmic composition can convert determination of blastomeres in Platynereis dumerlii (Annelida, Polychaeta) // Ibid. 1991. Vol. 200. P. 342–351.

Drenckhahn D., Brandner M., Kaiser H.-W. Asymmetrische Verteilung von F-Actin und Myosin in zentralnervösen Neuronen // Verh. Anat. Ges. 1984. Bd. 78. S. 567–569.

Drenckhahn D., Mannherz H.G. Distribution of actin and actin-associated proteins, myosin, tropomyosin, alpha-actinin, vinculin and villin in rat and bovine exocrine glands // Europ. J. Cell Biol. 1983. Vol. 30, N 2. P. 167–176.

Driesh H. Zur Verlagerung der Blastomeren des Echinideneies // Anat. Anz. 1893. Bd. 8. S. 348–357.

Driesch H. Analytische Theorie der organischen Entwicklung. Leipzig.: Engelmann, 1894. 184 S.

Driesch H. Der Begriff der organischen Form // Abhandlungen zur theoretischen Biologie. B.: Borntraeger, 1919. H. 3. S. 83.

Driever W., Nüsslein-Volhard C. A gradient of bicoid proteins in Drosophila embryos // Cell. 1988. Vol. 54, N 1. P. 83–93.

Driever W., Nüsslein-Volhard C. The bicoid protein is a positive regulator of hunchback transcription in the early Drosophila embryo // Nature. 1989. Vol. 337. P. 138–143.

Dubois P., Chen C.-P. Calcification in echinoderms // Echinoderm Stud. 1989. Vol. 3. P. 109–178.

Dufresne L., Swezey R.R., Epel D. Kinetics of actin assembly attending fertilization of artifical activation of sea urchin eggs // Exp. Cell Res. 1987. Vol. 172, N 1. P. 32–42.

Dunn G.A., Heath J.P. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells // Ibid. 1976. Vol. 101, N 1. P. 1–14.

Duspiva F. Mitosis in differentiation, morphogenesis and cancer // Mitosis: Facts and questions. B.: Springer, 1978. P. 121–145.

Dybas L., Fankboner P.V. Holothurian survival strategies mechanisms for the maintenance of a bacteriostatic environment in the coelomic cavity of the sea cucumber, Parastichopus californicus // Develop. Comp. Immunol. 1986. Vol. 10, N 3. P. 311–330.

Eckert B.S., Warren R.H., Rubin R.W. Structural and biochemical aspects of cell motility in amoebas of Dictyostelium discoideum // J. Cell Biol. 1977. Vol. 72. P. 339–350.

Edds K.T. Dynamic aspects of filopodial formation by reorganization of microfilaments // J. Cell Biol. 1977. Vol. 73. P. 479–491.

Edds K.T. Coelomocyte cytoskeleton: Interaction with cytochalasin B // Exp. Cell Res. 1980. Vol. 130. P. 371–376.

Edds K.T. Differential distribution and function of microtubules and microfilaments in sea urchin coelomocytes // Cell Motil. 1984. Vol. 4. P. 269–281.

Edds K.T., Venuti-Henderson J. Coelomocyte spectrin // Ibid. 1983. Vol. 3. P. 683–691.

Ellison J., Garrod D.R. Anchoring filaments of the amphibian epidermal-dermal junction traverse the basal lamina entirely from the plasma membrane of hemidesmosomes to the dermis // J. Cell Sci. 1984. Vol. 72. P. 163–172.

Ellison M.L., Ambrose E.J., Easty G.C.I. Chondrogenesis in chick embryo somites in vit-

ro. 2. Myogenesis in chick embryo somites in vitro // J. Embryol. and Exp. Morhol. 1969. Vol. 21, pt 2. P. 331–346.

Elsdale T. The generation and maintenance of parallel arrays in cultures of diploid fibroblasts // Biology of fibroblast. N.Y.; L.: Acad. press, 1973. P. 41–58.

Elsdale T., Bard J. Collagen substrata for studies on cell behavior // J. Cell Biol. 1972. Vol. 54, N 3. P. 626–636.

Elsdale T., Foley R. Morphogenetic aspects of multilayering in Petri cultures of human fetal lung fibroblasts // Ibid. 1969. Vol. 41, N 1. P. 298–311.

Elsdale T., Wasoff F. Fibroblast cultures and dermatoglyphics: The topology of two planar patterns // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1976. Vol. 180, N 2. P. 121–147.

Emlet R.B. Echinoderm calcite: A mechanical analysis from larval spicules // Biol. Bull. 1982. Vol. 163. P. 264–275.

Endean R. The coelomocytes and coelomic fluids // Physiology of Echinodermata. N.Y.: Wiley, 1980. P. 301–326.

Endo S., Toriyama M., Ohta K., Sakai H. Formation of miniasters in the cytoplasm of hexyleneglycol-treated sea urchin eggs // Cell Motil. Cytoskel. 1990. Vol. 15. P. 23–33.

Epel D. An overview of fertilization in a comparative and evolutionary context // Advances in invertebrate reproduction. N.Y.: Elsevier, 1984. Vol. 3. P. 53–62.

Epel D. The initiation of development at fertilization // Cell Diferr. and Develop. 1990. Vol. 29. P. 1–12.

Ettensohn C.A., McClay D.R. The regulation of primary mesenchyme cell migration in the sea urchin embryo: Transplantations of cells and latex beads // Develop. Biol. 1986. Vol. 117, N 2. P. 380–391.

Ettensohn C.A., McClay D.R. A new method for isolating primary mesenchyme cells of the sea urchin embryo // Exp. Cell Res. 1987. Vol. 168. P. 431–438.

Ettensohn C.A., McClay D.R. Cell lineage conversion in the sea urchin embryo // Develop. Biol. 1988. Vol. 125, N 2. P. 396–409.

Ezzell R.M., Cande W.Z., Brothers A.J. Ca^{2+}-ionophore-induced microvilli and contraction in Xenopus eggs: Evidence for involvement of actomyosin // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1985. Vol. 194, N 3. P. 140–147.

Farach M.C., Valdizan M., Park H.R., Decker G.L., Lennarz W.J. Developmental expression of a cell-surface protein involved in calcium uptake and skeleton formation in sea urchin embryos // Develop. Biol. 1987. Vol. 122, N 2. P. 320–331.

Fernandez J., Olea N., Matte C. Structure and development of the egg of the glossiphoniid leech Theromyzon rude: Characterization of developmental stages and structure of the early uncleaved egg // Development. 1987. Vol. 100, N 2. P. 211–225.

Fernandez J., Olea N., Tellez V., Matte C. Structure and development of the egg of the glossiphoniid leech Theromyzon rude: Reorganization of the fertilized egg during completion of the first meiotic division // Develop. Biol. 1990. Vol. 137, N 1. P. 142–154.

Fey E.G., Capco D.G., Krochmalnig G., Penman S. Epithelial structure revealed by chemical dissection and unembedded electron microscopy // J. Cell Biol. 1984a. Vol. 99, N 2. pt 2. P. 203s–208s.

Fey E.G., Penman S. The morphological oncogenic signature: Reorganization of epithelial cytoarchitecture and metabolic regulation by tumor promoters and by transformation // Developmental biology: A comprehenscive treatise. N.Y.: Plenum press, 1986. P. 81–100.

Fey E.G., Wan K.M., Penman S. Epithelial cytoskeletal framework and nuclear matrix – intermediate filament scaffold: Three-dimensional organization and protein composition // J. Cell Biol. 1984b. Vol 98, N 6. P. 1973–1984.

Fifkova E., Delay R. Cytoplasmic actin in neuronal processes as a possible mediator of synaptic plasticity // Ibid. 1982. Vol. 95, N 1. P. 345–350.

Fischbach G.C., Lass G. Acetylcholine noise in cultured chick myoblast: A voltage clamp analysis // J. Physiol. 1978. Vol. 280. P. 515–526.

Fischman D.A. Introduction: Myofibrillar assembly // Muscle development: Molecular and cellular control. Cold Spring Harbor; N.Y., 1982. P. 397–404.

Fisher W.S. Structure and functions of oyster hemocytes // Immunity in invertebrates. B.; Heidelberg: Springer, 1986. P. 25–35.

Fleming T.P., Cannon P.M., Pickering S.J. The cytoskeleton, endocytosis and cell polarity in the mouse preimlantation embryo // Develop. Biol. 1986a. Vol. 113, N 2. P. 406–419.

Fleming T.P., Pickering S.J., Qasim F., Maro B. The generation of cell surface polarity in mouse 8-cell blastomeres: The role of cortical microfilaments analysed using cytochalasin D // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986b. Vol. 95. P. 169–191.

Flickinger R.A. Muscle and cartilage differentiation in small and large explants from chick embryo limb bud // Develop. Biol. 1974. Vol. 41, N 1. P. 202–208.

Flickinger R.A. The effect of growth rate on differentiation of chick limb bud mesenchyme in organ culture // Exp. Cell Res. 1976. Vol. 99, N 2. P. 449–453.

Foley D.A., Cheng T.C. Morphology, hematologic parameters and behavior of hemolymph cells of the quahand clam, Mercenaria mercenaria // Biol. Bull. 1974. Vol. 146. P. 343–356.

Foley D.A., Cheng T.C. A quantitative study of phagocytosis by hemolymph cells of the pelecypods Crassostrea virginica and Mercenaria mercenaria // J. Invertebr. Pathol. 1975. Vol. 25. P. 189–197.

Fountain A.R., Lambert P. The fine structure of the leucocytes of the holothuria Cucumaria miniata // Canad. J. Zool. 1977. Vol. 55. P. 1530–1544.

Freeman G. The role of asters in the localization of the factors that specify the apical tuft and gut of the nemertine Cerebratulus lacteus // J. Exp. Zool. 1978. Vol. 206, N 1. P. 81–108.

Freeman G. The multiple roles which cell division can play in the localization of developmental potential // Determinants of spatial organization. N.Y.: Acad. press, 1979. P. 53–76.

Fristrom D. The cellular basis of epithelial morphogeneisis // Tissue and Cell. 1988. Vol. 20, N 5. P. 645–690.

Fujiwara K., Pollard T. Simultaneous localization of myosin and tubulin in human tissue culture cells by double antibody staining // J. Cell Biol. 1978. Vol. 77. P. 182–195.

Fukuda J., Henkart M., Fischbach G., Smith T.G. Physiological and structural properties of colchicine-treated chick skeletal muscle cells grown in tissue culture // Develop. Biol. 1976. Vol. 49. P. 395–411.

Fukui Y., Murray J., Riddelle K.S., Soll D.R. Cell behavior and actomyosin organization in Dictyostelium during substrate exploration // Cell Struct. Funct. 1991. Vol. 16. P. 289–301.

Fulton A. How do eukaryotic cells construct their cytoarchitecture? // Cell. 1981. Vol. 24. P. 4–11.

Gabella G. Hypertrophic smooth muscle: Size and shape of cells: Occurrence of mitosis // Cell and Tissue Res. 1979. Vol. 201. P. 63–78.

Gaginskaya E.R., Kasyanov V.L., Kogan G.L. Amplification of ribosomal genes and formation of extrachromosomal nucleoli in oocytes of starfish Henricia hayashi (Asteroidea: Echinasteridae) // Cell Differ. 1988. Vol. 23, N 1. P. 53–60.

Gagnon M.L., Angerer L.M., Angerer R.C. Posttranscriptional regulation of echinoderm-specific gene expression in early sea urchin embryos // Development. 1992. Vol. 114. P. 457–467.

Gall L., Picheral B., Gounon P. Cytochemical evidence for the presence of intermediate filaments and microfilaments in the egg of Xenopus laevis // Biol. Cell. 1983. Vol. 47, N 3. P. 331–342.

Garbi C., Nitsch L., Wollman S.H. Embedding in a collagen gel stabilizes the polarity of epithelial cells in thyroid follicles in suspension culture // Exp. Cell Res. 1984. Vol. 151, N 2. P. 458–465.

Gautier J., Tencer R. Involvement of the cytoskeleton in early grey crescent formation in axolotle oocytes // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1987. Vol. 196. P. 316–320.
Gearhart J.D., Mintz B. Contact-mediated myogenesis and increased acetylcholinesterase activity in primary cultures of mouse teratocarcinoma cells // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986. Vol. 71. P. 1734–1738.
Geiger B. Involvement of vinculin in contact-induced cytoskeletal interaction // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1982. Vol. 46, pt 2. P. 671–682.
Geiger B., Avnur Z., Rinnerthaler G. et al. Microfilament-organizing centers in areas of cell contact: Cytoskeletal interactions during cell attachment and locomotion // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 1. pt 2. P. 83s–91s.
Gelfand V.I., Gluchankova N.A., Ivanova O.Yu. et al. Polarization of cytoplasmic fragments microsurgically detached from mouse fibroblasts // Cell Biol. Intern. Rep. 1985. Vol. 9. N 10. P. 883–892.
Gibbins J.R., Tilney L.G., Porter K.R. Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in Arbacia punctulata. 1. The distribution of microtubules // J. Cell Biol. 1969. Vol. 41, N 1. P. 201–226.
Gilbert S. Developmental biology. Sunderland: Sinauer, 1985. 726 p.
Giudice G. Restitution of whole larvae from disaggregated cells of sea urchin embryos // Develop. Biol. 1962. Vol. 5. P. 402–411.
Giudice G., Mutolo V. Reaggregation of dissociated cells of sea urchin embryos // Adv. Morphogenesis. 1970. Vol. 8. P. 115–158.
Godsave S.F., Anderton B.H., Heasman J., Wylie C.C. Oocytes and early embryos of Xenopus laevis contain intermediate filaments which react with anti-mammalian vimentin antibodies // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1984a. Vol. 83. P. 169–187.
Godsave S.F., Wylie C.C., Lane E.B., Anderton B.H. Intermediate filaments in the Xenopus oocyte: The appearance and distribution of cytokeratin-containing filaments // Ibid. 1984b. Vol. 83. P. 157–167.
Goldenberg R.Z., Greenberg A.H., Gerrard I.M. Activation of lobster hemocytes: Cytoarchitectural aspects // J. Invertebr. Pathol. 1986. Vol. 47, N 2. P. 143–154.
Good D. Mitosis of embryonic heart muscle cells in vitro: An immunofluorescence and ultrastructural study // Cytobilogie. 1975. Vol. 11. P. 203–229.
Goodman B.E., Crandall E.D. Dome formation in primary cultured monolayers of alveolar epithelial cells // Amer. J. Physiol. 1982. Vol. 243, N 1. P. c99–c100.
Gordon R.A. A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1985. Vol. 89, suppl. P. 229–255.
Gould D., Benson S.C. Selective inhibition of collagen cynthesis in sea urchin embryos by a low concentration of actinomycin D // Exp. Cell Res. 1978. Vol. 112. P. 73–78.
Green H., Thomas J. Pattern formation by cultured human epidermal cells: Development of curved ridges resembling dermatoglyphs // Science. 1978. Vol. 200, N 4348. P. 1385–1388.
Grinnell F., Lamke C.R. Reorganization of hydrated collagen lattices by human skin fibroblasts // J. Cell Sci. 1984. Vol 66. P. 51–63.
Grobstein C. Differentiation: Environmental factors, chemical and cellular // Cells and tissues in culture. N.Y.; L.: Acad. press, 1965. Vol. 1. P. 112–131.
Gumpel-Pinot M., Ede D.A., Flint O.P. Myogenic cell movement in the developing avian limb bud in presence and absence of the apical ectodermal ridge // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1984. Vol. 80. P. 105–125.
Gunderson R.W., Shapiro B.M. Sperm surface proteins persist after fertilization // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 4. pt I. P. 1343–1353.
Gunning B.E.S. The cytokinetic apparatus: Its development and spatial regulation // The cytoskeleton in plant growth and developmetn. L. etc.: Acad. press, 1982. P. 230–292.
Gustafson T. Cellular behavior and cytochemistry in early stages of development // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B. etc.: Springer, 1975. P. 231–266.

Gustafson T., Sävhagen R. Studies on the determination of the oral side of the urchin. 1. The effect of some detergent on the development // Ark. zool. 1950. Vol. 42, N 10. P. 1–6.
Gustafson T., Wolpert L. Studies on the cellular basis of morphogenesis in the sea urchin embryo: Directed movements of primary mesenchyme cells in normal and vegetalized larvae // Exp. Cell Res. 1961. Vol. 24, N 1. P. 64–79.
Gustafson T., Wolpert L. The cellular basis of morphogenesis and sea urchin development // Intern. Rev. Cytol. 1963. Vol. 15. P. 139–214.
Gustafson T., Wolpert L. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis // Biol. Rev. 1967. Vol. 42, N 3. P. 442–498.
Gutzeit H.O., Sander K. Establishment of polarity in the insect egg // Biology of fertilization. Orlando etc.: Acad. press, 1985. Vol. 1. P. 347–378.
Haba de la G., Amundsen R. The contribution of embryo extact to myogenesis of avian striated muscle in vitro // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1972. Vol. 69. P. 1131–1135.
Haba de la G., Kamali H.M., Tiede D.M. Myogenesis of avian striated muscle in vitro: Role of collagen in myofiber formation // Ibid. 1975. Vol. 72. P. 2729–2732.
Hagström B.E., Lönning S. Time-lapse and electron microscopic studies of sea urchin micromeres // Protoplasma. 1969. Vol. 68. P. 271–288.
Hamaguchi Y., Mabuchi I. Alpha-actinin accumulation in the cortex of echinoderm eggs during fertilization // Cell Motil. and Cytoskel. 1986. Vol. 6. P. 549–559.
Hammarback J.A., Palm S.L., Furcht L.T., Letourneau P.C. Guidance of neurite outgrowth by pathways of substratum-absorbed laminin // J. Neurosci. Res. 1985. Vol. 13, N 1/2. P. 213–220.
Harkey M.A., Whiteley A.H. Isolation, culture and differentiation of echinoid primary mesenchyme cells // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1980. Vol. 189, N 2. P. 111–122.
Harkey M.A., Whiteley A.H. The translational program during the differentiation of isolated primary mesenchyme cells // Cell Differ. 1982. Vol. 11, N 5/6. P. 325–329.
Harkey M.A., Whiteley A.H. Mass isolation and culture of sea urchin micromeres // In vitro. 1985. Vol. 21, N 2. P. 108–113.
Harris A.K. Cell traction in relationship to morphogenesis and malignancy // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.: Plenum press, 1986. Vol. 3. P. 339–357.
Harris A.K., Stopak D., Warner P. Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical alternative to the Turing model // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1984. Vol. 80. P. 1–20.
Harris A.K., Stopak D., Wild P. Fibroblast traction as a mechanism for collagen morphogenesis // Nature. 1981. Vol. 290, N 5803. P. 249–251.
Harris A.K., Wild P., Stopak D. Silicone rubber substrata: A new wrinkle in the study of cell locomotion // Science. 1980. Vol. 208, N 4440. P. 177–179.
Harris P.J., Clason E.L., Prier K.R. Tubulin polymerization in unfertilized sea-urchin eggs induced by elevated temperature // J. Cell Sci. 1989. Vol. 93. P. 9–17.
Harvey E.B. The American Arbacia and other sea urchins. Princeton: Univ. press, 1956. P. 121–144.
Hatanaka K., Okada M. Retarded nuclear migration in Drosophila embryos with aberrant F-actin reorganization caused by maternal mutations and by cytochalasin treatment // Development. 1991a. Vol. 111. P. 909–920.
Hatanaka K., Okada M. Mutations affecting embryonic F-actin reorganization also effect separation of nuclei from their sisters and from the cortex in Drosophila cleavage embryos // Develop., Growth and Differ. 1991b. Vol. 33, N 5. P. 535–542.
Hauptman R.J., Perry B.A., Capco D.G. A freeze-sectioning method for preparation of the detergent-resistant cytoskeleton identifies stage-specific cytoskeletal proteins and associated mRNA in Xenopus oocytes and embryos // Ibid. 1989. Vol. 31, N 2. P. 157–164.
Hauschka S., Konigsberg I.R. The influence of collagen on the development of muscle clones // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1966. Vol. 55. P. 119–126.

Hawkins R.J., April E.W. Liquid crystals in living tissues // Adv. Liquid Cryst. 1983. Vol. 6. P. 243–264.
Hay E. Interaction of embryonic cell surface and cytoskeleton with extracellular matrix // Amer. J. Anat. 1982. Vol. 165, N 1. P. 1–12.
Hay E. Cell-matrix interaction in the embryo: Cell spape, cell surface, cell skeleton and their role in differentiation // The role of extracellular matrix in development. N.Y.: Liss, 1984. P. 1–31.
Hayward L.S., Schwartz R.J. Sequential expression of chicken actin genes during myogenesis // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102. P. 1485–1493.
Henry J.J., Martindale M.Q. The organizing role of D quadrant as revealed through the phenomena of twinning in the polychaete Chaetopterus variopedatus // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1987. Vol. 196, N 8. P. 499–510.
Henson J.H., Begg D.A. Filamentous actin organization in the unfertilized sea urchin egg cortex // Develop. Biol. 1988. Vol. 127, N 2. P. 338–348.
Herberts C. Donnees recentes sur les mechanismes de reconnaissance et de defence de type immunitaire chez les mollusques // Ann. Inst. Michel Pacha. 1978. Vol. 11. P. 38–66.
Hill C.S., Duran S., Lin Z., Weber K., Holtzer H. Titin and myosin, but not desmin are linked during myofibrillogenesis in postmitotic mononucleated myoblasts // J. Cell Biol. 1986. Vol. 103, N 6, pt 1. P. 2185–2196.
Hill D.P., Strome S. An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in Caenorhabditis elegans zygotes // Develop. Biol. 1988. Vol. 125, N 1. P. 75–84.
Hill D.P., Strome S. Brief cytochalasin-induced disruption of microfilaments during a critical interval in 1–cell C. elegans embryos alters the partitioning of developmental instructions to the 2–cell embryo // Development. 1990. Vol. 108. P. 159–172.
Hinegardner R.T. Morphology and genetics of sea urchin development // Amer. Zool. 1975. Vol. 15, N 3. P. 679–689.
Hiramoto Y. Mechanical properties of the surface of the sea urchin egg at fertilization and following cleavage // Exp. Cell Res. 1974. Vol. 89. P. 320–326.
Hirokawa N., Tilney L.G., Fujiwara K., Heuser J.E. Organization of actin, myosin and intermediate filaments in the brush border of intestinal epithelial cells // J. Cell Biol. 1982. Vol. 94, N 2. P. 425–443.
Holland N.D. Electron microscopic study of development in a sea cucumber, Stichopus tremulus (Holothuroidea), from unfertilized egg through hatched blastula // Acta zool. 1981. Vol. 62, N 2. P. 89–111.
Holland N.D., Phillips J.H., Giese A.C. An autoradiographic investigation of coelomocyte production in the purple sea urchin (Strongylocentrotus purpuratus) // Biol. Bull. 1965. Vol. 128. P. 259–270.
Holtfreter J. Directed movements and selective adhesion in embryonic amphibian development // Molecular and cellular aspects of development. N.Y.: Harper and Row, 1965. P. 5–37.
Holtzer H., Bennett G.S., Tapscott S.J., Croop J.M., Dlugocz A., Toyama Y. Changes in intermediate-sized filaments during myogenesis and neurogenesis // International cell biology, 1980–1981. B.: Springer, 1981. P. 293–305.
Holtzer H., Forry-Schaudies S., Antin P., Dubyak G., Nachmias V. Induction of incoordinate synthesis of muscle proteins by the tumor promoter TPA and the carcinogen EMS // Gene expression in muscle. N.Y.: Plenum press, 1985a. P. 179–191.
Holtzer H., Forry-Schaudies S., Dlugocz A., Antin P., Dubyak G. Interactions between IFs, microtubules and myofibrils in fibrogenic and myogenic cells // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1985b. Vol. 455. P. 106–125.
Holtzer H., Sasse J., Antin P., Tokunaka S., Pacifici M., Horwitz A., Holtzer S. Lineages, DNA synthesis, postmitotic myoblasts and myofibrillogenesis // Exp. Biol. Med. 1984. Vol. 9. P. 126–134.
Holtzer H., Strahls K., Biehl J., Somlyo A.P., Ishikawa H. Thick and thin filaments in postmitotic mononucleated nyoblasts // Science. 1975. Vol. 188. P. 943–945.

Hopkins C.R. Polarity signals // Cell. 1991. Vol. 66. P. 827–829.
Hormia M., Badley R.A., Lehto V.-P., Virtanen I. Actomyosin organization in stationary and migrating sheets of cultured human endothelial cells // Exp. Cell Res. 1985. Vol. 157, N 1. P. 116–126.
Hörstadius S. Vegetalization of the sea-urchin egg by dinitrophenol and animalization by trypsin and ficin // J. Embryol. ans Exp. Morphol. 1953. Vol. 1. P. 327–348.
Hörstadius S. Experimental embryology of echinoderms. Oxford: Clarendon press, 1973. 192 p.
Hörstadius S. Isolation and transplantation experiments // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B.: Springer, 1975. P. 231–266.
Hörstadius S., Gustafson T. The effect of three antimetabolites on sea-urchin development // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1954. Vol. 2. P. 216–226.
Hosoya H., Mabuchi I. A 45, 000-mol-wt protein – actin complex from unfertilized sea urchin egg affects assembly properties of actin // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 3. P. 994–1001.
Houliston E., Elinson R.P. Patterns of microtubule polymerization relating to cortical rotation in Xenopus laevis eggs // Development. 1991. Vol. 112. P. 107–117.
Huysecom J., Jangoux M., Vray B. Les coelomocytes de l'oursin Paracentrotus lividus (Lamarck): Types morphologiques et pouvoir phagocytaire // Symbioses. 1983. Vol. 15, N 4. P. 216.
Hynes R.O. Integrins: A family of cell surface receptors // Cell. 1987. Vol 48. P. 549–554.
Hynes R.O. Fibronectins. N.Y.: Springer, 1990. 546 p.
Ikenishi K., Nakazato S., Okuda S. Direct evidence for the presence of germ cell determinant in vegetal pole cytoplasm of Xenopus laevis eggs and in a subcellular fraction of it // Develop., Growth and Differ. 1986. Vol. 28, N 6. P. 563–568.
Inestrosa N.C. Differentiation of skeletal muscle cells in culture // Cell Struct. and Funct. 1982. Vol. 7, N 2. P. 92–109.
Ishihara A., Holifield B., Jacobson K. Analysis of lateral distribution of a plasma membrane glycoprotein – monoclonal antibody complex which occurs during cell locomotion // J. Cell Biol. 1988. Vol. 106. P. 329–343.
Ishikawa H. Formation of elaborate networks of T-system tubules in cultured skeletal muscle with special reference to the T-system formation // Ibid. 1968. Vol. 38. P. 51–66.
Isobe Y., Shimada Y. Myofibrillogenesis in vitro as seen with the scanning electron microscope // Cell and Tissue Res. 1983. Vol. 231, N 3. P. 481–494.
Ivanenkov V.V., Meshcheryakov V.N., Martynova L.E. Surface polarization in loach eggs and two-cell embryos: Correlations between surface relief, endocytosis and cortex contractility // Intern. J. Develop. Biol. 1990. Vol. 34. P. 337–345.
Iwata M., Nakano E. A large calcium-binding protein associated with the larval spicules of the sea urchin embryo // Cell Differ. 1986. Vol. 19. P. 229–236.
Jack R., Rajewski K., Karp I. Adhesion to substrate as a developmental process in murine teratoma embryoid bodies // Exp. Cell Res. 1975. Vol. 96. P. 180–188.
Jacob M., Christ B., Jacob H.J. The migration of myogenic cells from the somites into the leg region of avian embryos // Anat. Embryol. 1979. Vol. 157. P. 291–309.
Jacobson K., O'Dell D., Holifield B. et al. Redistribution of a major cell surface glycoprotein during cell movement // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99. N 5. P. 1613–1623.
Jaffe L. Effect of polarized light on polarity of Fucus // Science. 1956. Vol. 123, N 3207. P. 1081–1082.
Jangoux M. Diseases of Echinodermata. 1. Agents microorganisms and protistans. 2. Agents metazoans (Mezozoa to Bryozoa). 3. Agents metazoans (Annelida to Pisces) // Dis. Aquat. Org. 1987. Vol. 1. P. 147–162; Vol. 2. P. 205–234; Vol. 3. P. 59–83.
Jeffery W.R. Maternal RNA and the embryonic localization problem // Embryonic gene expression. Boca Raton: CRC press, 1983. P. 73–114.
Jeffery W.R. Pattern formation by ooplasmic segregation in ascidian eggs // Biol. Bull. 1984. Vol. 166, N 2. P. 277–298.

Jeffery W.R. The spatial distribution of maternal mRNA is determined by a cortical cytoskeletal domain in Chaetopterus eggs // Develop. Biol. 1985. Vol. 110. P. 217–229.
Jeffery W.R. *The role of cytoplasmic determinants in embryonic development* // Developmental biology: A comprehensive treatise. N.Y.: Plenum press, 1988. Vol. 5. P. 3–56.
Jeffery W.R. An ultraviolet-sensitive maternal mRNA encoding a cytoskeletal protein may by involved in axis formation in the ascidian embryo // Develop. Biol. 1990a. Vol. 141. P. 141–148.
Jeffery W.R. Ultraviolet irradiation during ooplasmic segregation prevents gastrulation, sensory cell induction and axis formation in the ascidian embryo // Ibid. 1990b. Vol. 140. P. 388–400.
Jeffery W.R., Bates W.R., Beach R.L., Tomlinson C.R. Is maternal mRNA a determinant of tissue-specific proteins in ascidian embyos? // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 97, suppl. P. 1–14.
Jeffery W.R., Meier S. Ooplasmic segregation of the myoplasmic actin network in stratified ascidian eggs // W. Roux'x Arch. Develop. Biol. 1984. Vol. 193, N 4. P. 257–262.
Jeffery W.R., Swalla B.J. The myoplasm of ascidian eggs: A localized cytoskeletal domain with multiple roles in embryonic development // Seminars Cell Biol. 1990. Vol. 1. P. 373–381.
Jeffery W.R., Tomlinson C.R., Brodeur R.D., Meier S. The yellow crescent of ascidian eggs: Molecular organization, localization and role in early development // Molecular aspects of early development. N.Y.: Plenum press, 1984. P. 1–38.
Jeong K.H., Heyneman D. Leukocytes of Biomphalaria glabrata: Morphology and behavior of granulocytic cells in vitro // J. Invertebr. Pathol. 1976. Vol. 28. P. 357–362.
Jockusch B.M. Patterns of microfilament organization in animal cells // Mol. and Cell. Endocrinol. 1983. Vol. 29, N 1. P. 1–20.
Jockusch B.M., Haemmerli G., Albon A.I. Cytoskeletal organization in locomoting cells of the V2 rabbit carcinoma // Exp. Cell Res. 1983. Vol. 90. P. 311–334.
Johnson L.G., Manger R.M., May G.K. Evans blue treatment promotes blastomere separation and twinning in Lytechinus pictus embryos // Develop. Biol. 1989. Vol. 131. P. 276–279.
Johnson M.H., Maro B. A dissection of the mechanisms generating and stabilizing polarity in mouse 8 – and 16 – cell blastomeres: the role of cytoskeletal elements // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1985. Vol. 90. P. 311–334.
Johnson M.H., McConnell J., Van Blerkom J. Programmed development in the mouse embryo // Ibid. 1984. Vol. 83, suppl. P. 197–231.
Johnson M.H., Pickering S.J., Dhiman A., Radcliffe G.S., Maro B. Cytocortical organization during natural and prolonged mitosis of mouse 8-cell blastomeres // Development. 1988. Vol. 102, N 1. P. 143–158.
Johnson M.H., Ziomek C.A. Induction of polarity in mouse 8-cell blastomeres: Specificity, geometry and stability // J. Cell Biol. 1981. Vol. 91, N 1. P. 303–308.
Johnson P.T. The coelomic elements of sea urchins (Strongylocentrotus). 1. The normal coelomocytes, their morphology and dynamics in hanging drop // J. Invertebr. Pathol. 1969a. Vol. 13, N 1. P. 25–41.
Johnson P.T. The coelomic elements of sea urchins (Strongylocentrotus). 2. In vitro reaction to bacteria // Ibid. 1969a. Vol. 13, N 1. P. 42–62.
Jones G.E., Partridge T. Limpet haemocytes: Effect of cytochalasin B and colchicine on cell spreading and aggregation // J. Cell Sci. 1974. Vol. 16. P. 385–400.
Just E.E. Basic methods for experments on eggs of *marine animals. Philadelphia:* Blakiston, 1939. 89 p.
Kadokawa Y. Morphogenetic movement of cell sheet during embryogenesis in echinoderms // Develop., Growth and Differ. 1983. Vol. 25, *N 4. P. 402.*
Kadokawa Y., Dan-Sohkawa M., Eguchi G. Studies on the mechanism of blastula formation in *starfish embryos* denuded of fertilization membrane // Cell Differ. 1986. Vol. 19, N 2. P. 79–88.
Kalderon N., Epstein M.L., Gilula N.B. Cell-to-cell communication and *myogenesis* // J. Cell *Biol. 1977. Vol. 75. P. 788–806.*
Kalderon N., Gulula N.B. Membrane events involved in myoblast fusion // Cell Biol. 1979. Vol. 81. P. 411–423.
Kallenbach R.J. The induction of de novo centrioles in sea urchin eggs: a possible common mechanism for centriolar activation among parthenogenetic procedures // Europ. J. Cell Biol. 1983. Vol. 30, N 1. P. 159–166.
Kallenbach R.J. Ultrastructural analysis of the initiation and development of cytasters in sea urchin eggs // J. Cell Sci. 1985. Vol. 73. P. 261–278.
Kalthoff K., Elbetieha A. Transplantation of localized anterior *determinants in Chironomus* eggs by microinjection // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 97, suppl. P. 181–196.
Kane R.E. Actin polymerization and interaction with other *proteins in temperature*-induced gelation in sea urchin egg extracts // J. Cell Biol. 1976. Vol. 71. P. 701–714.
Kane R.E. Induction of either contractile or structural actin based gels in sea urchin egg cytoplasmic extract // Ibid. 1980. Vol. 86, N 3. P. 803–809.
Kane R.E. Structural and contractile roles of actin in sea urchin egg cytoplasmic extracts // Cell Differ. 1982. Vol. 11, N 5/6. P. 285–287.
Kane R.E. Interconversion of structural and *contractile actin gels by insertion* of myosin during assembly // J. Cell Biol. 1983. Vol. 97, N 6. P. 1745–1752.
Kanungo K. In vitro studies on the effect of cell-free coelomic fluid, calcium, and/or magnesium on clumping of coelomocytes of the *sea star Asterias forbesi (Echinodermata:* Asteroidea) // Biol. Bull. 1982. Vol. 163. P. 438–452.
Kanungo K. The coelomocytes of asteroid echinoderms // Comparative pathobiology. N.Y.; L.: Plenum press, 1984. Vol. 6. P. 7–39.
Karas R.H., Williams R.S. Molecular mechanisms of skeletal muscle adaptations to exercise // Trends Cardiovasc. Med. 1991. Vol. 1. P. 341–346.
Karp G.C., Solursch M. In vitro fusion and separation of sea urchin primary mesenchyme cells // Exp. Cell Res. 1985a. Vol. 158. P. 554–557.
Karp G.C., Solursh M. Dynamic activity of the filopodia of sea urchin embryonic cells and their role in directed migration of the primary mesenchyme in vitro // Develop. Biol. 1985b. Vol. 112, N 2. P. 276–283.
Karp R.D., Coffaro K. Cellular defence systems of the Echinodermata // The reticuloendothelial system: A comprehensive treatise. N.Y.; L.: Plenum press, 1982. Vol. 3. P. 257–282.
Karr T.L., Alberts B.M. Organization of the cytoskeleton in early Drosophila embryo // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102. P. 1494–1509.
Kataoka M., Tavassoli M. Polarization of membrane glycoprotein during monocyte chemotaxis // Exp. Cell Res. 1984. Vol. 153, N 2. P. 539–543.
Katow H. Behavior of sea urchin primary mesenchyme cells in artificial extracellular matrices // Exp. Cell Res. 1986. Vol. 162, N 2. P. 401–410.
Katow H. Inhibition *of cell surface binding* of fibronectin and fibronectin-promoted cell migration by synthetic peptides in sea urchin primary mesenchyme cells in vitro // Develop., Growth and Differ. 1987. Vol. 29, N 2. P. 579–589.
Katow H. A new techinque for introducing anti-fibronectin antibodies and fibronectin-related synthetic peptides into the blastulae of the sea urchin, Clypeaster japonicus // Ibid. 1990. Vol. 32, N 1. P. 33–39.
Katow H., Amemiya S. Behavior of primary mesenchyme *cells in situ associated with* ultrastructural alteration of the blastocoelic material in the sea urchin, Anthocidaris crassispina // Ibid. 1986. Vol. 28, N 1. P. 31–42.
Katow H., Solursch M. Ultrastructure of primary mesenchyme cell ingression in the sea urchin Lytechinus pictus // J. Exp. Zool. 1980. Vol. 213. P. 231–246.

Kaufman S.J., Foster R.F. Remodelling of the myoblast membrane accompanies development // Develop. Biol. 1985. Vol. 110, N 1. P. 1–14.
Kelly A.M., Chacko S. Myofibril organization and mitosis in cultured cardiac muscle cells // Ibid. 1976. Vol. 48. P. 421–430.
Kemp R.B. The effect of neuraminidase on the aggregation of cells dissociated from embryonic chick muscle //J. Cell Sci. 1970. Vol. 6. P. 751–766.
Kim W.S., Stocum D.L. Retinoic acid modifies positional memory in the anteroposterior axis of regenerating axolotl limbs // Develop. Biol. 1986. Vol. 114, N 1. P. 170–179.
Kim-Ha J., Smith J.L., Macdonald P.M. Oskar mRNA is localized to the posterior pole of the Drosophila oocyte // Cell. 1991. Vol. 66. P. 23–35.
King M.L., Barklis E. Regional distrubution of maternal messenger RNA in the amphibian oocyte // Develop. Biol. 1985. Vol. 112, N 1. P. 203–212.
Kinoshita T., Okazaki K. In vitro study on morphogenesis of sea urchin larval spicule: adhesiveness of cells // Zool. Sci. 1984. Vol. 1. P. 433–443.
Kirschner M., Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis // Cell. 1986. Vol. 45, N 3. P. 329–342.
Kirschner M., Newport J., Gerhart J. The timing of early developmental events in Xenopus // Trends Genet. 1985. Vol. 1, N 2. P. 41–47.
Kirschner M., Schultz E. Morphogenesis and the control of microtubule dynamics in cells // J. Cell Sci. 1986. Suppl. 5. P. 293–310.
Kitajima T. Differentiation of sea urchin micromeres: correlation between specific protein synthesis and spicule formation // Develop., Growth and Differ, 1986. Vol. 28, N 3. P. 233–242.
Kiyomoto M., Tsukahara J. Spicule formation–inducing substance in sea urchin embryo // Ibid. 1991. Vol. 33, N 5. P. 443–450.
Klebe R.J., Caldwell H., Milam S. Cells transmit spatial information by orienting collagen fibers // Matrix. 1989. Vol. 9. P. 451–458.
Kline D., Nuccitelli R. The wave of activation current in the Xenopus egg // Develop. Biol. 1985. Vol. 111, N 2. P. 471–487.
Klymkowski M.W., Maynell L.A., Pelson A.G. Polar asymmetry in the organization of the cortical cytokeratin system of Xenopus laevis oocytes and embryos // Development. 1987. Vol. 100, N 3. P. 543–557.
Knudsen K.A. The calcium-dependent myoblast adhesion that precedes cell fusion is mediated by glycoproteins // J. Cell Biol. 1985. Vol. 101, N 3. P. 891–897.
Knudsen K.A. Cell adhesion molecules in myogenesis // Curr. Opin. Cell Biol. 1990. Vol. 2. P. 902–906.
Knudsen K.A., Horowitz A.F. Tandem events in myoblast fusion // Develop. Biol. 1977. Vol. 58. P. 328–338.
Knudsen K.A., McElwee S.A., Myers L. A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis // Develop. Biol. 1990a. Vol. 138, N 1. P. 159–168.
Knudsen K.A., Myers L., McElwee S.A. A role for the Ca^{2+} dependent adhesion molecule, N-cadherin, in myoblast interaction during myogenesis // Exp. Cell Res. 1990b. Vol. 188. P. 175–184.
Kobayashi S. Observations on the shape of skeletons formed in vitro by the descendents of isolated micromeres of sea urchin // Zool. Mag. 1977. Vol. 86. P. 124–127.
Kolega J. The cellular basis of epithelial morphogenesis // Developmental biology. N.Y.: Plenum press, 1986a. Vol. 2. P. 103–143.
Kolega J. Effect of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture // J. Cell Biol. 1986b. Vol. 102, N 4. P. 1400–1411.
Kominami T. Determination of dorso-ventral axis in early embryos of the sea urchin, Hemicentrotus pulcherrimus // Develop. Biol. 1988. Vol. 127, N 1. P. 187–196.
Konigsberg I.R. The differentiation of cross– striated myofibrils in short-term cell cultures // Exp. Cell Res. 1960. Vol. 21. P. 414–421.

Konigsberg I.R. Aspects of cytodifferentiation of skeletal muscle // Organogenesis. N.Y.: Holt, Rinehart and Winston, 1965. P. 337–358.
Konigsberg I.R. Skeletal myogenesis in culture // Meth. Enzymol. 1979. Vol. 58. P. 511–527.
Konigsberg I.R., Pfister K.K. Replicative and differentiative behavior in daughter pairs of myogenic stem cells // Exp. Cell Res. Vol. 167, N 1. P. 63–74.
Korenbaum E., Linhartova I., Viklicky V. Changing antigenic pattern of tubulin-containing structures during spreading of Mizuhopecten yessoensis (Mollusca) hemocytes // Protoplasma. 1990. Vol. 154. P. 91–97.
Kovacs P., Hegyesi H., Csaba G. Effect of vanadate and ouabain on insulin binding and insulin imprinting in Tetrahymena // Cell Biochem. Funct. 1992. Vol. 10. P. 31–34.
Kumagai H., Imazawa M., Miyamoto K. Unusual morphological changes in cultures oligodendrocytes induced by cytochalasin B // Develop. Brain Res. 1986. Vol. 27. P. 270–274.
Kunieda M., Wakahara M. Twin formation in Xenopus laevis eggs centrifuged before first cleavage // Zool. Sci. 1987. Vol. 4. P. 489–496.
Kuraishi R., Osanai K. Structural and functional polarity of starfish blastomeres // Develop. Biol. 1989. Vol. 136, N 2. P. 304–310.
Küster E. Normale und abnormale Keimungen bei Fucus // Ber. Dt. bot. Ges. 1906. Bd. 24. S. 522–528.
Lackie J.M. Cell movement and cell behavior. L. etc.: Allen and Unwin, 1986. 316 p.
Lallier R. Effect d'un acide ribonucleique "soluble" de levure sur la morphogenese de l'oeuf de l'Oursin Paracentrotus lividus // C. r. Acad. sci. D. 1964. Vol. 259. P. 2140–2142.
Lallier R. Les modifications experimentales de la morphogenèse chez la larve d'oursin: Essai d'interpretation des effets des agents animalisants et végétalisants // Ann. Biol. Ser. 4. 1966a. Vol. 5, N 7/8. P. 313–335.
Lallier R. Relations entre la structure des polyamines et leur action sur la différenciation de l'oeuf de l'Oursin Paracentrotus lividus // C. r. Acad. sci. D. 1966b. Vol. 262. P. 1460–1463.
Lallier R. Morphogenetic effects of acidic glycoproteins on the development of sea urchin eggs // Nature. 1966c. Vol. 211. P. 99.
Lallier R. Modifications de la differenciation de la larve de l'Oursin Paracentrotus lividus par la pronase // C. r. Acad. sci. D. 1967. Vol. 265. P. 751–753.
Lallier R. Recherches sur les modifications expérimentales de la différenciation de la larve d'Oursin par les enzymes protéolytiques // C. r. Soc. biol. 1969. Vol. 163, N 10. P. 2028–2032.
Lallier R. Animalization and vegetalization // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B.: Springer, 1975. P. 473–509.
Lallier R., Chang P., Sardet C. La polarite de l'oeuf d'oursin et les inducteurs de la differenciation // Ann. Biol. 1981. Vol. 20, N 3. P. 201–225.
Lane M.C., Solursch M. Dependence of sea urchin primary mesenchyme cell migration on xyloside- and sulfate-sensitive cell surface-associated components // Develop. Biol. 1988. Vol. 127, N 1. P. 78–87.
Lass J., Fischbach G.D. A discontinuous relationship between the acetylcholin-activated channel conductance and temperature // Nature. 1976. Vol. 263. P. 150–151.
Lee E.Y.-H., Lee W.-H., Kaetzel C.S., Parry C., Bissell M. Interaction of mouse mammary epithelial cells with collagen substrata: regulation of casein gene expression and secretion // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1985. Vol. 82. P. 1419–1423.
Lee K.K.H., Ede D.A. A study on skeletal myogenic cell movement in the developing avian limb bud // Anat. Embryol. 1989. Vol. 180. P. 293–300.
Lehtonen E. A monoclonal antibody against mouse oocyte cytoskeleton recognizing cytokeratin-type-filaments // J. Embryol. and. Exp. Morphol. 1958. Vol. 90. P. 197–209.
Lepage T., Chiglione C., Gache C. Spatial and temporal expression pattern during sea ur-

chin embryogenesis of a gene coding for a protease homologous to the human protein BMP-1 and to the product of the Drosophila dorsal-ventral patterning gene tolloid // Development. 1992a. Vol. 114. P. 147–164.
Lepage T., Sardet C., Gache C. Spatial expression of the hatching enzyme gene in the sea urchin embryo // Develop. Biol. 1992b. Vol. 150. P. 23–32.
Letourneau P.C. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation // Ibid. 1975. Vol. 44, N 1. P. 92–101.
Letourneau P.C. Cell-substratum adhesion of neurite growth cones, and its role in neurite elongation // Exp. Cell Res. 1979. Vol. 124, N 1. P. 127–138.
Leven R.M., Nachmias V.T. Cultured megakaryocytes: changes in the cytoskeleton after ADP-induced spreading // J. Cell Biol. 1984. Vol 92, N 2. P. 313–323.
Levy J.A., Weiss R.M., Dirksen E.R., Rosen M.R. Possible communication between murine macrophages oriented in linear chains in tissue culture // Exp. Cell Res. 1976. Vol. 103. P. 375–386.
Levy J.B., Johnson M.H., Goodball H., Maro B. The timing of compaction: control of a major developmental transition in mouse early embryogenesis // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 95. P. 213–237.
Lewis C.A. Ultrastructure of a fertilized barnacle egg (Pollicipes polymerus) with peristaltic constructions // W. Roux's Arch. Entwicklungsmech Organism. 1977. Bd. 181, N 4. S. 333–355.
Lindahl E. Zur experimentellen Analyse der Determination der Dorsoventralachse beim Seeigelkeim. 1. Versuche mit gestreckten Eiern // Ibid. 1933. Bd. 127. S. 301–322.
Lindberg U., Markey F. Platelet microfilaments and motility // Platelets: Biology and pathology. Amsterdam etc., 1987. Vol. 3. P. 205–237.
Lipton B.H. A fine-structural analysis of normal and modulated cells in myogenic cultures // Develop. Biol. 1977a. Vol. 60, N 1. P. 26–47.
Lipton B.H. Collagen synthesis by normal and bromodeoxyuridine-modulated cells in myogenic culture // Ibid. 1977b. Vol. 61, N 2. P. 153–165.
Lipton B.H., Konigsberg I.R. A fine-structural analysis of the fusion of myogenic cells // J. Cell. Biol. 1972. Vol. 53. P. 348–364.
Livingston B.T., Shaw R., Bailey A., Wilt F. Characterization of a cDNA encoding a protein involved in formation of the skeleton during development of the sea urchin Lytechinus pictus // Develop. Biol. 1991. Vol. 148. P. 473–480.
Lloyd C.W. Actin in plants // J. Cell Sci. 1988. Vol. 90. P. 185–188.
Lloyd C.W. How does the cytoskeleton read the laws of geometry in aligning the division plane of plant cells? // Development. 1991a. Suppl. 1. P. 55–65.
Lloyd C.W. Cytoskeletal elements of the phragmosome establish the division plane in vacuolated higher plant cells // The cytoskeletal basis of plant growth and form. N.Y. etc.: Acad. press, 1991b. P. 245–257.
Lloyd C.W., Traas J.A. The role of F-actin in determining the division plane of carrot suspension cells: Drug studies // Development. 1988. Vol. 102. P. 211–221.
Lohs-Shardin M. Dicephalic – a Drosophila mutant affecting polarity in folllicle organization and embryonic patterning // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1982. Vol. 191, N 1. P. 20–36.
Lois P., Izquierdo L. Cell membrane regionalization and cytoplasm polarization in the rat early embryo // Ibid. 1984. Vol. 193, N 4. P. 205–210.
Longo F.J. Organization of microfilaments in sea urchin (Arbacia punctulata) eggs at fertilization: Effects of cytochalasin B // Develop. Biol. 1980. Vol. 74, N 2. P. 422–433.
Longo F.J. Fine structure of the mammalian egg cortex // Amer. J. Anat. 1985. Vol. 174, N 3. P. 303–315.
Longo F.J. Fertilization cones of inseminated sea urchin (Arbacia punctulata) oocytes: Development of an asymmetry in plasma membrane topology // Gamete Res. 1986. Vol. 16, N 1. P. 137–151.
Mabuchi I., Hamaguchi Y., Kobayashi T. et al. Alpha-actinin from sea urchin eggs: Biochemical properties, interaction with actin and distribution in the cell during fertilization and cleavage // J. Cell Biol. 1985. Vol. 100, N 2. P. 375–383.
Mabuchi I., Hosoya H. Actin-modulating proteins in Echinoderm eggs // Actin: Structure and function in muscle and non-muscle cells. Sydney etc.: Acad. press, 1983. P. 309–316.
Maglott D.R. Dissociation of cells from sea urchin embryos alters the synthesis of actins and other proteins // Cell Differ. 1985. Vol. 17, N 1. P. 29–43.
Marinos E. Observations on the mitochondrial distribution in normal, rotated and cold-treated 2-cell stage embryos of Xenopus laevis // Ibid. 1986. Vol. 18, N 3. P. 163–171.
Markus N.H. Effects of pronase on the development of reversed symmetry and duplications in the sea urchin, Arbacia punctulata // Develop. Biol. 1981. Vol. 83. P. 387–390.
Maro B., Howlett S.K., Houliston E. Cytoskeletal dynamics in the mouse egg // J. Cell Sci. 1986. Vol. 85, suppl. 5. P. 343–359.
Maro B., Johnson M.N., Webb M., Flach G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: An interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 92. P. 11–32.
Maro B., Pickering S.J. Microtubules influence compaction in preimplantation mouse embryo // Ibid. 1984. Vol. 84. P. 217–232.
Maroudas N.G. Chemical and mechanical requirements for fibroblast adhesion // Nature. 1973. Vol. 244. P. 353–354.
Marsland D.A. The mechanism of cell division: Hydrostatic pressure effects upon dividing egg cells // J. Cell and Comp. Physiol. 1939. Vol. 13, N 1. P. 15–21.
Martindale M.Q., Doe C.Q., Morrill J.B. The role of animal-vegetal interaction with respect to the determination of dorso-ventral polarity in the equal-cleaving spiralian, Lymnaea palustris // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1985. Vol. 194, N 5. P. 281–295.
Maruyama Y.K., Nakaseko Y., Yagi S. Localization of cytoplasmic determinants responsible for primary mesenchyme formation and gastrulation in the unfertilized egg of the sea urchin Hemicentrotus pulcherrimus // J. Exp. Zool. 1985. Vol. 236, N 2. P. 155–163.
Mason P.W., Jacobson B.S. Isolation of the dorsal, ventral and intracellular domains of Hela cell plasma membrane following adhesion to a gelatin substrate // Biochim. et biophys. acta. 1985. Vol. 821, N 2. P. 264–276.
Matranga V., Kuwassaki B., Noll H. Functional characterization of toposomes from sea urchin beastula embryos by a morphogenetic cell aggregation assay // EMBO J. 1986. Vol. 5, N 12. P. 3125–3132.
Matsuda R., Kitajima T., Ohinata, Katoh Y., Higashinakagawa T. Micromere differentiation in the sea urchin embryo: two-dimensional gel electrophoretic analysis of newly synthesized proteins // Develop., Growth and Differ. 1988. Vol. 30, N 1. P. 25–33.
Matus A., Ackermann M., Pehling G. et al. High actin concentrations in brain dendritic spines and postsynaptic densities // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79, N 23. P. 7590–7594.
Mayne R., Abbott J., Schiltz J. Studies concerning the divergence of myoblast and fibroblast precursor cells during myogenesis in vitro // J. Cell Biol. 1972. Vol. 55, N 2. Pt 2. P. 168.
McCarthy R.A., Spiegel M. Serum effects on in vitro differentiation of sea urchin micromeres // Exp. Cell Res. 1983. Vol. 149. P. 433–441.
McCartney M.D., Buck R.C. Comparison of the degree of contact guidance between tumor cells and normal cells in vitro // Cancer Res. 1981. Vol. 41. P. 3046–3051.
McClay D.R., Hausman R.E. Specificity of cell adhesion: Differences between normal and hybrid sea urchin cells // Develop. Biol. 1975. Vol. 47, N 2. P. 454–460.
McMahon U.J., Slater C.R. The influence of basal lamina on the accumulation of acetylcholine receptors at synaptic sites in regenerating muscle // J. Cell Biol. 1984. Vol. 98, N 4. P. 1453–1473.
Meller K., Tetzlaff W. Scanning electron microscopic studies on the development of the chick retina // Cell and Tissue Res. 1976. Vol. 170. P. 145–159.

Menko A.S., Toyama Y., Boettiger D., Holtzer H. Altered cell spreading in cytochalasin B: A possible role for intermediate filaments // Mol. and Cell Biol. 1983. Vol. 3, N 1. P. 113–125.
Menzel D. Visualization of cytoskeletal changes through the life cycle in Acetabularia // Protoplasma. 1986. Vol. 134, N 11. P. 30–42.
Millonig G. A study on the formation and structure of the sea urchin spicule // J. Submicrosc. Cytol. 1970. Vol. 2. P. 157–165.
Minna J., Glazer D., Nirenberg M. Genetic dissection of neural properties using somatic cell hybrids // Nature. 1972. Vol. 235. P. 225–231.
Mintz G.R., De Francesco S., Lennarz W.J. Spicule formation by cultured embryonic cells from the sea urchin // J. Biol. Chem. 1981. Vol. 256, N 24. P.13105–13111.
Miyachi Y., Iwata M., Sato H., Nakano E. Effect of fibronectin on cultured cells derived from isolated micromeres of the sea urchin, Hemicentrotus pulcherrimus // Zool. Sci. 1984. Vol. 1. P. 265–271.
Mlodzik M., Gehring W.J. Expression of the caudal gene in the germ line of Drosophila: Formation of an RNA and protein gradient during early embryogenesis // Cell. 1987. Vol. 48. P. 465–478.
Monk M. Genome imprinting // Genes and Develop. 1988. Vol. 2. P. 921–925.
Monné L. Some observations on the polar and dorsoventral organization of the sea-urchin egg // Ark. zool. A. 1946. Vol. 38, N 15. P. 1–13.
Monroy A., Parisi E. Cell line segregation as a key event of embryonic development // Individuality and determinism. N.Y.: Plenum press, 1984. P. 89–125.
Montesano R. Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: An in vitro approach // Experientia. 1986. Vol. 42, N 9. P. 977–985.
Moon R.T., Nicosia R.F., Olsen C. et al. The cytoskeletal framework of sea urchin eggs and embryos: Developmental changes in the association of messenger RNA // Develop. Biol. 1983. Vol. 95, N 2. P. 447–458.
Moore C.A., Eble A.F. Cytochemical aspects of Mercenaria mercenaria hemocytes // Biol. Bull. 1977. Vol. 152. P. 105–119.
Moore M.N., Lowe D.M. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of Mytilus edulis and their responses to experimentally injected carbon particles // J. Invertebr. Pathol. 1977. Vol. 29. P. 18–30.
Mooseker M.S. Organization, chemistry and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border // Annu. Res. Cell Biol. 1985. Vol. 1. P. 209–241.
Mooseker M.S., Bonder B.M., Conzelman K.A. et al. Brush border cytoskeleton and integration of cellular function // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 1, pt 2. P. 104s–112s.
Morgan T.H. Experimental embryology. N.Y.: Columbia Univ. press, 1927. 766 p.
Morton D.G., Roos J.M., Kemphues K.J. Par-4, a gene required for cytoplasmic localization and determination of specific cell types in Caenorhabditis elegans embryogenesis // Genetics. 1992. Vol. 130. P. 771–790.
Moscona A.A. Development of heterotypic combinations of dissociated embryonic chick cell // Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 1956. Vol. 92. P. 410–416.
Moscona A.A., Moscona H. The dissociation and aggregation of cells form organ rudiments of the early chick embryos // J. Anat. 1952. Vol. 86. P. 287–301.
Moss M., Asch B., Schwartz R. Differentiation of actin-containing filaments during chick skeletal myogenesis // Exp. Cell Res. 1979. Vol. 121. P. 167–178.
Muir A. The structure and distribution of satellite cells // Proc. Intern. conf. Inst. Muscle Disease. N.Y., 1970. P. 231–241.
Murakami R., Suzuki M., Fuji K., Yamaoka I. Organization of actin filaments and zonula adherens during somitogenesis in the chick embryo // Develop. Growth and Differ. 1989. Vol. 31, N 2. P. 123–130.
Murray L.W., Tanzer M.L. The collagens of annelids // Biology of ivertebrate and lower vertebrate collagens. N.Y.; L.: Plenum press, 1985. P. 243–258.
Nameroff M. Myogenesis in a skeletal muscle tumor // Proc. Intern. conf. Inst. Muscle Disease. N.Y., 1970. P. 231–241.

Nameroff M., Holtzer H. Contact-mediated reversible suppression of myogenesis // Develop. Biol. 1969. Vol. 19. P. 380–396.
Nameroff M., Munar E. Inhibition of cellular differentiation by phospholipase C // Ibid. 1976. Vol. 49. P. 288–293.
Nappi A.J. Parasite encapsulation in insects // Invertebrate immunity: Mechanisms of invertebrate vector-parasite relations. N.Y. etc.: Acad. press, 1975. P. 293–326.
Nathanson M.A. Formation of cartilage by non-chondrogenic cell types // J. Cell Biol. 1977. Vol. 75, N 2, pt 2. P. 30a.
Nelson D.R., Jaffe L.F. Cells without cytoplasmic movements respond to cytochalasin // Develop. Biol. 1973. Vol. 30, N 1. P. 206–208.
Nelson S.H., McClay D.R. Cell polarity in sea urchin embryos: Reorientation of cells occurs quickly in aggregates // Ibid. 1988. Vol. 127. P. 235–247.
Newport J., Kirschner M. A major developmental transition in early Xenopus embryos. 1. Characterization and timing of cellular changes at the mid-blastula stage // Cell. 1982. Vol. 30. P. 675–686.
Nigon V., Guerrier P., Monin H. L'architercture polaire de l'oeuf et les mouvements des constituants cellulaires au cours des premières étapes du dévelopment chez quelques nématodes // Bull. Biol. Fr. et Belg. 1960. T. 93. P. 131–202.
Nishida H. Cell lineage analysis in ascidian embryo by intracellular injection of a tracer enzyme // Develop. Biol. 1987. Vol. 121. P. 526–541.
Nogami H., Urist M.R. Substrate prepared from bone matrix for chondrogenesis in tissue culture // J. Cell Biol. 1974. Vol. 62, N 2. P. 510–519.
Noll H., Matranga V., Cervello M. et al. Characterization of toposomes from sea urchin blastula cells: A cell organelle mediating cell adhesion and expressing positional information // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1985. Vol. 82, N 23. P. 8062–8066.
Nothnagel E.A., Barak L.S., Sanger J.W., Webb W.W. Fluorescence studies on models of cytochalasin B and phallotoxin action on cytoplasmic streaming in Chara // J. Cell Biol. 1981. Vol. 88, N 2. P. 364–372.
Nübler-Jung K. Tissue polarity in an insect segment: denticle patterns resemble spontaneously forming fibroblast patterns // Development. 1987. Vol. 100. P. 171–177.
Nuccitelli R. Ooplasmic segregation and secretion in the Pelvetia egg is accompanied by a membrane-generated electrical current // Develop. Biol. 1978. Vol. 62, N 1. P. 13–33.
Nuccitelli R. Transcellular ion currents: Signals and effectors of cell polarity // Modern cell biology. N.Y.: Liss, 1983. Vol. 2. P. 451–481.
Nuccitelli R. The involvement of transcellular ion currents and electric fields in pattern formation // Pattern formation: A primer in developmental biology. L. etc.: MacMillan, 1984. P. 23–46.
Nuccitelli R., Poo M.-M., Jaffe L. Relations between ameboid movement and membrane-controlled electrical currents // J. Gen. Physiol. 1977. Vol. 69, N 6. P. 743–764.
Nuccitelli R., Wiley L.M. Polarity of isolated blastomeres from mouse morulae: Detection of transcellular ion currents // Develop. Biol. 1985. Vol. 109, N 2. P. 452–463.
Nüsslein-Volhard C. Determination of the embryonic axes of Drosophila // Development. 1991. Suppl. 1. P. 1–10.
Odell G.M. A mathematically modelled cytogel cortex exhibits periodic Ca^{++} modulated contraction cycles seen in Physarum shuttle streaming // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1984. Vol. 83, suppl. P. 261–287.
Ohta T., Kawano S., Kuroiwa T. Migration of the cell nucleus during the amoebo-flagellate transformation of Physarum polycephalum is mediated by an actin-generated force that acts on the centrosome // Protoplasma. 1991. Vol. 163. P. 114–124.
Okada M., Togashi S. Isolation of a factor inducing pole cell formation from Drosophila embryos // Intern. J. Invertebr. Reprod. 1985. Vol. 8, N 4/5. P. 207–217.
Okazaki K. Skeleton formation of sea urchin larvae. 2. Organic matrix of the spicule // Embryologia. 1960. Vol. 5. P. 283–320.
Okazaki K. Skeleton formation of sea urchin larvae. 4. Correlation in shape of spicule and matrix // Ibid. 1962. Vol. 7. P. 21–38.

Okazaki K. Spicule formation by isolated micromeres of sea urchin embryo // Amer. Zool. 1975a. Vol. 15, N 3. P. 567–582.

Okazaki K. Normal development to metamorphosis // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B. etc.: Springer, 1975b. P. 177–232.

Okazaki K., Inoué S. Crystal property of the larval sea urchin spicule // Develop., Growth and Differ. 1976. Vol. 18. P. 413–434.

Okazaki K., McDonald K., Inoué S. Sea urchin larval spicule observed with the scanning electron microscope // The mechanisms of biomineralization in animals and plants. Tokyo: Tokai Univ. press, 1980. P. 159–168.

Oliver J.M., Berlin R.D. Mechanisms that regulate the structural architecture of cell surface // Intern. Rev. Cytol. 1982. Vol. 74. P. 55–94.

Oliver J.M., Berlin R.D. Microfilament-membrane interactions and the movement of ligands over cell surface // Actin: Structure and function in muscle and non-muscle cells. Sydney etc.: Acad. press, 1983. P. 259–266.

Oliver J.M., Caron J.M., Berlin R.D. New concepts of the control of cell surface structure and function // Muscle and non-muscle motility. N.Y. etc.: Acad. press, 1983. Vol. 2. P. 153–201.

Olson E.N., Brennan T.J., Chakraborty T., Cheng T.-C., Cserjesi P., Endmondson D., James G., Li L. Molecular control of myogenesis: Antagonism between growth and differentiation // Mol. and Cell. Biochem. 1991. Vol. 104. P. 7–13.

O'Neill M.C., Stockdale F.E. Muscle differentiation and BUdR incorporation // J. Cell Biol. 1972. Vol. 55, N 2, pt 2. P. 196a.

Oster G.F. Mechanochemistry and morphogenesis // Biological structures and coupled flows. N.Y.: Philadelphia: Acad. press, 1983. P. 417–443.

Oster G.F., Odell G.M. The mechanochemistry of cytogels // Physica D. 1984. Vol. 12. P. 333–350.

Otey C.A., Kalnoski M.H., Bulinski J.C. Immunolocalization of muscle and nonmuscle isoforms of actin in myogenic cells and adult skeletal muscle // Cell Motil. Cytoskel. 1988. Vol. 9, N 4. P. 337–348.

Otto J.J., Kane R.E., Bryan J. Formation of filopodia in coelomocytes: Localization of fascin, a 58000 dalton actin cross-linking protein // Cell. 1979. Vol. 17. P. 285–293.

Otto J.J., Schroeder T.E. Microtubule arrays in the cortex and near germinal vesicle of immature starfish oocytes // Develop. Biol. 1984. Vol. 101, N 2. P. 274–281.

Overtone J. Response of epithelial and mesenchymal cells to culture on basement lamella observed by scanning microscopy // Exp. Cell Res. 1977. Vol. 105. P. 313–323.

Owaribe K. The role of cytoskeletal proteins in epithelial structure and morphogenesis // Cell Struct. and Funct. 1983. Vol. 8, N 4. P. 392.

Parthasarathy M.V., Perdue T.D., Witztum A., Alvernaz J. Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells // Amer. J. Bot. 1985. Vol. 72, N 8. P. 1318–1323.

Partridge T., Davies P.S. Limpet haemocytes. 2. The role of spikes in locomotion and spreading // J. Cell Sci. 1974. Vol. 14. P. 319–330.

Pavans de Ceccatty M. Cytoskeletal organization and tissue patterns of epithelia in the sponge Ephydatia mülleri // J. Morphol. 1986. Vol. 189, N 1. P. 45–65.

Pearson M.L. Muscle differentiation in cell culture // The molecular genetics of development. N.Y.: Acad. press, 1980. P. 361–418.

Periasamy M., Gregory P., Martin B.J., Stirewalt W.S. Regulation of myosin heavy-chain gene expression during skeletal muscle hypertrophy // Biochem. J. 1989. Vol. 257. P. 691–698.

Perry B.A., Capco D.G. Spatial reorganization of actin, tubulin and histone mRNAs during meiotic maturation and fertilization in Xenopus oocytes // Cell Differ. Develop. 1988. Vol. 25. P. 99–108.

Picheral B., Charbonneau M. Anuran fertilization: A morphological reinvestigation of some early events // J. Ultrastruct. Res. 1982. Vol. 81, N 3. P. 306–321.

Pienkowski M., Solter D., Koprowski H. Early mouse embryo: Growth and differentiation in vitro // Exp. Cell Res. 1974. Vol. 85. P. 424–428.

Piyachaturawat P., Suvitayawat W., Glinsukon T. Stimulation of gastric mucus and protein secretion by cytochalasin E in rats // Cell Biol. Intern. Rept. 1986. Vol. 10, N 9. P. 707–716.

Plancha C.E., Carmo-Fonseca M., David-Ferreira J.F. Cytokeratin filaments are present in golden hamster oocytes and early embryos // Differentiation. 1989. Vol. 42, N 1. P. 1–9.

Poder M., Cahour A., Babouet G. Reactions hemocytaires a l'injection de corps bacteriens on de substances inertes chez Ostrea edulis L. (Mollusca, Bivalvia) // Malacologia. 1982. Vol. 22. P. 9–14.

Pokrywka N.J., Stephenson E.C. Microtubules mediate the localization of bicoid RNA during Drosophila oogenesis // Development. 1991. Vol. 114. P. 55–66.

Porter K.R. Structural organization of sytomatrix // The organization of cell metabolism. N.Y.: Plenum press, 1987. P. 9–25.

Pratt H.P.M. Membrane organization in the preimplantation mouse embryo // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1985. Vol. 90. P. 101–121.

Pratt H.P.M., George M.A. Organization and assembly of the surface membrane during early cleavage of the mouse embryo // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1989. Vol. 198. P. 170–178.

Prenant M. Contributions à l'étude cytologique du calcaire. 3. Observations sur le déterminisme de la forme spiculaire chez les larvae pluteus d'Oursins // Bull. Biol. 1926a. Vol. 60, n 4. P. 522–560.

Prenant M. Sur le déterminisme de la forme spiculaire chez les larvae d'Oursins // C.r. Soc. biol. 1926b. Vol. 94. P. 433–435.

Proce M.G., Sanger J.W. Intermediate filaments in striated muscle // Cell and muscle motility. N.Y.: Plenum press, 1983. Vol. 3. P. 1–40.

Pucci-Minafra I., Fanara M., Minafra S. Chemical and physical changes in the organic matrix of mineralized tissues from embryo to adult Paracentrotus lividus // J. Submicrosc. Cytol. 1980. Vol. 12. P. 267–273.

Pudney J., Singer R.H. Electron microscopic visualization of the filamentous reticulum in whole cultured presumptive chick myoblasts // Amer. J. Anat. 1979. Vol. 156. P. 321–336.

Puri E.C., Caravatti M., Perriard J.-C., Turner D.C., Eppenberger H.M. Anchorage-independent muscle cell differentiation // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1980. Vol. 77. P. 5297–5301.

Puri E.C., Turner D.C. Serum-free medium allows chicken myogenic cells to be activated in suspension and separated from attached fibroblasts // Exp. Cell Res. 1978. Vol. 115. P. 159–174.

Quatrano R.S. An ultrastructural study of the formation in Fucus zygotes // Ibid. 1972. Vol. 70, N 1. P. 1–12.

Quatrano R.S. Separation of processes associated with differentiation of two-celled Fucus embryos // Develop. Biol. 1973. Vol. 30, N 1. P. 209–213.

Quatrano R.S. Developmental biology: Development in marine organisms // Experimental marine biology. N.Y.; L.: Acad. press, 1974. P. 303–346.

Quatrano R.S. Development of cell polarity // Annu. Rev. Plant Physiol. 1978. Vol. 29. P. 487–510.

Quatrano R.S., Griffing L.R., Huber-Walchli V., Doubet R.S. Cytological and biochemical requirements for the establishment of a polar cell // J. Cell Sci. 1985. Vol. 78, suppl. 2. P. 129–141.

Raff R.A., Showman R.M. Maternal messenger RNA: Quantitative, qualitative and spatial control of its expression in embryos // Biology of fertilization. 1985. Vol. 3. P. 402–452.

Ramirez O., Aleman V. Modification of muscle cell phenotype in monolayer culture by different media // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1972. Vol. 28, pt 3. P. 559–570.

Rappaport R. Establishment and organization of the cleavage mechanism // Molecular and cell movement. N.Y.: Raven press, 1975. P. 287–304.
Rappaport R. Effects of continual mechanical agitation prior to cleavage in echinoderm eggs // J. Exp. Zool. 1978. Vol. 206, N 1. P. 1–11.
Rappaport R. Repeated furrow formation from a single mitotic apparatus in cylindrical sand dollar eggs // J. Exp. Zool. 1985. Vol. 235. P. 167–171.
Rappaport R., Rappaport B.N. Surface contractile activity associated with isolated asters in cylindrical sand dollar eggs // Ibid. 1985. Vol. 235. P. 217–226.
Ratcliffe N.A., Rowley A.F., Fitzgerald S.W., Rhodes C.P. Invertebrate immunity: Basic concepts and recent advances // Intern. Rev. Cytol. 1985. Vol. 97. P. 183–350.
Ray R.P., Arora K., Nüsslein-Volhard C., Gelbart W.M. The control of cell fate along the dorsal-ventral axis of the Drosophila embryo // Development. 1991. Vol. 113. P. 35–54.
Reade P., Reade E. Phagocytosis in invertebrates: Studies on the hemocytes of the clam Tridacna maxima // J. Invertebr. Pathol. 1976. Vol. 28. P. 281–290.
Rehhun L.I. Induction of amoeboid movement in marine eggs // Molecular and cell movement. N.Y.: Raven press, 1975. P. 233–238.
Reima I., Lehtonen E. Localization of nonerythroid spectrin and actin in mouse oocytes and preimplantation embryos // Differentiation. 1985. Vol. 30, N 1. P. 65–67.
Reinisch C.L., Bang F.B. Cell recognition: Reactions of the sea star (Asterias vulgaris) to the injection of amoebocytes of sea urchin (Arbacia punctulata) // Cell Immunol. 1971. Vol. 2, N 5. P. 496–503.
Render J.-A. Development of Ilyanassa obsoleta embryos after equal distribution of polar body material at first cleavage // Develop. Biol. 1989. Vol. 132, N 1. P. 241–250.
Renwrantz L. Involvement of agglutinins (lectins) in invertebrate defence reactions: The immunobiological importance of carbohydrate-specific binding molecules // Develop. Comp. Immunol. 1983. Vol. 7. P. 603–608.
Reynolds S.D., Angerer L.M., Palis J., Nasir A., Angerer R.C. Early mRNAs, spatially restricted along the animal-vegetal axis of sea urchin embryos, include one encoding a protein related to tolloid and BMP-1 // Development. 1992. Vol. 114. P. 769–786.
Richardson W., Kitajima T., Wilt F., Benson S. Expression of an embryonic spicule matrix gene in calcified tissues of adult sea urchin // Develop. Biol. 1989. Vol. 132. P. 266–269.
Roch P., Canicatti C., Sammarco S. Tetrameric structure of the active phenoloxidase evidenced in the coelomocytes of the echinoderm Holothuria tubulosa // Comp. Biochem. and Physiol. B. 1992. Vol. 102. P. 349–355.
Rosenspire A.J., Bremner T.A., Pogell B.M. Expression of differentiated function in cultures of isolated sea urchin micromeres // Biol. Bull. 1976. Vol. 151. P. 427.
Roth S., Stein D., Nüsslein-Volhard C. A gradient of nuclear localization of the dorsal protein determines dorsoventral pattern in the Drosophila embryo // Cell. 1989. Vol. 59, N 6. P. 1189–1202.
Rovensky Yu.A., Vasiliev Yu.M. Surface topography of suspended tissue cells // Intern. Rev. Cytol. 1984. Vol. 90. P. 273–308.
Rulon O. Developmental modifications in the sand dollar caused by zinc chloride and prevented by glutathione // Biol. Bull. 1955. Vol. 109, N 2. P. 316–327.
Runnström J. Integrating factors // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B., Springer, 1975. P. 646–670.
Ruohola H., Bremer K.A., Baker D., Swedlow J.R., Jan Y.N. Role of neurogenic genes in establishment of follicle cell fate and oocyte polarity during oogenesis in Drosophila // Cell. 1991. Vol. 66. P. 433–449.
Rutishauser U., Acheson A.K., Mann D.M., Sunshine J. The neural cell adhesion molecule (NCAM) as a regulator of cell-cell interactions // Science. 1988. Vol. 240. P. 53–57.
Saitoh O., Arai T., Obinata T. Distribution of microtubules and other cytoskeletal filaments during myotube elongation as revealed by fluorescence microscopy // Cell and Tissue Res. 1988. Vol. 252. P. 263–273.
Sammarco S., Canicatti C. Phenoloxydase and lipidic pigments in enriched Holothuria polii coelomocyte populations // Echinoderm research, 1991. Rotterdam: Balkema, 1992. P. 217–220.
Sanger J.W., Mittal B., Sanger J.M. Analysis of myofibrillar structure and assembly using fluorescently labeled contractile proteins // J. Cell Biol. 1984. Vol. 98. P. 825–833.
Sanger J.M., Sanger J.W. Role of actin and microtubules in cell shape determination // Ibid. 1977. Vol. 75, pt 2. P. 55a.
Sanger J.W., Sanger J.M. Surface and shape changes during cell division // Cell and Tissue Res. 1980a. Vol. 209, N 2. P. 177–186.
Sanger J.W., Sanger J.M. Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells // J. Cell Biol. 1980b. Vol. 86, N 2. P. 568–575.
Sardet C. The ultrastructure of the sea urchin egg cortex isolated before and after fertilization // Develop. Biol. 1984. Vol. 105, N 1. P. 196–210.
Sardet C., Chang P. The egg cortex: From maturation through fertilization // Cell Differ. 1987. Vol. 21, N 1. P. 1–19.
Sargent T.D., Jamrich M., Dawid I.B. Cell interactions and the control of gene activity during early development of Xenopus laevis // Develop. Biol. 1986. Vol. 114. P. 238–246.
Sapienza C., Tran T.-H., Paquette J., McGowan R., Peterson A. A methylation mosaic model for mammalian genome imprinting // Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol. 1989. Vol. 36. P. 145–157.
Sawada T. How ooplasm segregated bipolarly in ascidian eggs // Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi. 1983. Vol. 17, N 3. P. 123–140.
Sawada T. The mechanism of ooplasmic segregation in the ascidian egg // Zool. Sci. 1988. Vol. 5. P. 667–675.
Sawada T., Osanai K. Distribution of actin filaments in fertilized egg of the ascidian Ciona intestinalis // Develop. Biol. 1985. Vol. 111, N 1. P. 260–265.
Sawada T., Schatten G. Microtubules in ascidian eggs during meiosis, fertilization, and mitosis // Cell Motil. and Cytoskel. 1988. Vol. 9. P. 219–230.
Schatten G. The movements during fertilization // J. Wash. Acad. Sci. 1982. Vol. 72, N 1. P. 12–23.
Schatten G. The supramolecular organization of the cytoskeleton during fertilization // Subcellular biochemistry. N.Y.; L.: Plenum press, 1984. Vol. 10. P. 359–453.
Schatten G., Schatten H. Effects of motility inhibitors during sea urchin fertilization // Exp. Cell Res. 1981. Vol. 135, N 2. P. 311–330.
Schatten G., Schatten H., Spector I., Cline C., Paweletz N., Simerly C., Petzelt C. Latrunculin inhibits the microfilament-mediated processes during fertilization, cleavage and early development in sea urchins and mice // Ibid. 1986a. Vol. 166, N 1. P. 191–208.
Schatten G., Simerly C., Schatten H. Microtubule configurations during fertilization, mitosis and early development in the mouse and the requirement for egg microtubule-mediated motility during mammalian fertilization // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1985. Vol. 82, N 12. P. 4152–4156.
Schatten H., Cheney R., Balczon R., Willard M., Cline C., Simerly C., Schatten G. Localization of fodrin during fertilization and early development of sea urchin and mice // Develop. Biol. 1986c. Vol. 118.
Schatten H., Howard C., Coffe G., Simerly C., Schatten G. Centrosomes, centrioles and post-translationally modified microtubules during fertilization // Zool. Sci. 1988. Vol. 5. P. 585–601.
Schatten H., Schatten G. Motility and centrosomal organization during sea urchin and mouse fertilization // Cell Motil. and Cytoskel. 1986. Vol. 6, N 2. P. 163–175.
Schatten H., Schatten G., Mazia D., Balczon R., Simerly C. Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1986b. Vol. 83, N 1. P. 105–109.
Schatten H., Walter M., Mazia D., Biessmann H., Paweletz N., Coffe G., Schatten G. Centrosome detection in sea urchin eggs with a monoclonal antibody against Drosophila

intermediate filament proteins: Characterization of stages of the division cycle of centrosomes // Ibid. 1987. Vol. 84. P. 8488–8492.
Scheer U. Injection of antibodies into the nucleus of amphibian oocytes: an experimental means of interfering with gene expression in the living cell // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 97, suppl. P. 223–242.
Scheer U., Dabauvalle M.-C. Functional organization of the amphibian oocyte nucleus // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.; L.: Plenum press, 1985. Vol. 1. P. 385–430.
Scheer U., Hinssen H., Franke W.W., Jockusch B.M. Microinjection of actin-binding proteins and actin antibodies demostrates involvement of nuclear actin in transcription of lampbrush chromosomes // Cell. 1984. Vol. 39, N 1. P. 111–122.
Schierenberg E. Developmental strategies during early embryogenesis of Caenorhabditis elegans // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1986. Vol. 97, suppl. P. 31–44.
Schierenberg E. Reversal of cellular polarity and early cell-cell interaction in the embryo of Caenorhabditis elegans // Develop. Biol. 1987. Vol. 122, N 2. P. 452–463.
Schindler M., Jiang L.-W. Nuclear actin and myosin as control elements in nucleocytoplasmic transport // J. Cell Biol. 1986. Vol. 102, N 3. P. 859–862.
Schliwa M. The cytoskeleton: An introductory survey. Wien; N.Y.: Springer, 1986. 326 p.
Schmekel L. Egg and embryo ultrastructure // The sea urchin embryo: Biochemistry and morphogenesis. B.: Springer, 1975. P. 265–307.
Schneider E.G. Cell-cell recognition and adhesion during embryogenesis in the sea urchin: Demonstration of species-specific adhesion among Arbacia punctulata, Lytechinus variegatus and Strongylocentrotus purpurats // Biol. Bull. 1985. Vol. 168, N 1. P. 61–74.
Schneider M.D., Roberts R., Parker T.G. Modulation of cardiac genes by mechanical stress // Mol. Biol. Med. 1991. Vol. 8. P. 167–183.
Schroeder P.C., Talbot P. Ovulation in the animal kingdom: A review with an emphasis on the role of contractile processes // Gamete Res. 1985. Vol. 11, N 2. P. 191–221.
Schroeder T.E. Expression of the prefertilization polar axis in sea urchin eggs // Develop. Biol. 1980a. Vol. 79, N 2. P. 428–443.
Schroeder T.E. The jelly canal: Marker of polarity for sea urchin oocytes, egg and embryos // Exp. Cell Res. 1980b. Vol. 128, N 2. P. 490–494.
Schroeder T.E. Development of a "primitive" sea urchin (Eucidaris tribuloides): Irregularities in the hyaline layer, micromeres, and primary mesenchyme // Biol. Bull. 1981. Vol. 161. P. 141–151.
Schroeder T.E. Distinctive features of the cortex and cell surface of micromeres: observations and cautions // Cell Differ. 1982. Vol. 11, N 5/6. P. 289–290.
Schroeder T.E. The egg cortex in early development of sea urchin and starfish // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.; L.: Plenum press, 1986. Vol. 2. P. 59–102.
Schroeder T.E. Fourth cleavage of sea urchin blastomeres: microtubule patterns and myosin localization in equal and unequal cell divisions // Develop. Biol. 1987. Vol. 124, N 1. P. 9–22.
Schroeder T.E. Contact-independent polarization of the cell surface and cortex of free sea urchin blastomeres // Ibid. 1988. Vol. 125. P. 255–264.
Schroeder T.E., Otto J.J. Immunofluorescent analysis of actin and myosin in isolated contractile rings of sea urchin eggs // Zool. Sci. 1988. Vol. 5. P. 713–725.
Schroeder T.E., Otto J.J. Snoods: A periodic network containing cytokeratin in the cortex of starfish oocytes // Develop. Biol. 1991. Vol. 144, N 2. P. 240–247.
Schubert D., Lacorbiere M. Phenotypic transformation of clonal myogenic cells to cells resembling chondrocytes // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1976. Vol. 73. P. 1989–1993.
Scott M.P., O'Farrell P.H. Spatial programming of gene expression in early Drosophila embryogenesis // Annu. Rev. Cell Biol. 1986. Vol. 2. P. 49–80.
Serras F., Baud C., Moreau M., Guerrier P., Van den Biggelaar J.A.M. Intercellular communication in the early embryo of the ascidian Ciona intestinalis // Development. 1988. Vol. 102. P. 55–63.

Serras F., Dictus W.J.A.G., Van den Biggelaar J.A.M. Changes in junctional communication associated with cell cycle arrest and differentiation of trochoblasts in embryos of Patella vulgata // Develop. Biol. 1990. Vol. 137. P. 207–216.
Serras F., Speksnijder J.E. F-actin is a marker of dorsal induction in early Patella embryos // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1990. Vol. 199. P. 246–250.
Servise M., Wardlaw A.C. Echinochrome A as bactericidal substance in the coelomic fluid of Echinus esculentus (L.) // Comp. Biochem. and Physiol. B., 1984. Vol. 79, N 2. P. 161–165.
Sheetz M.P., Chasah R., Spudich J.A. ATP-dependent movement of myosin in vitro: Characterization of a quantitative assay // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 5. P. 1867–1871.
Sheterline P., Pickard J.E., Richards R.C. Involvement of the cortical actin filament network of neutrophil leucocytes during phagocytosis // Biochem. Soc. Trans. 1984. Vol. 12. P. 983–987.
Shimada Y. Electron microscope observations on the fusion of chick myoblasts in vitro // J. Cell Biol. 1971. Vol. 48. P. 128–142.
Shimizu K., Noro N., Matsuda R. Micromere differentiation in the sea urchin embryo: Expression of primary mesenchyme cell specific antigen during development // Develop., Growth and Differ. 1988. Vol. 30, N 1. P. 35–47.
Shimizu M., Yamada J. Light and electron microscope observations of the regenerating test in the sea urchin Strongylocentrotus intermedius // The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. Columbia: Univ. of Carolina press, 1976. P. 261–281.
Shimizu T. Ooplasmic segregation in the Tubifex egg: Mode of pole plasm accumulation and possible involvement of microfilaments // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1982. Vol. 191, N 4. P. 246–256.
Shimizu T. Dynamics of the actin microfilament system in the Tubifex egg during ooplasmic segregation // Develop. Biol. 1984. Vol. 106, N 2. P. 414–426.
Shimizu T. Movements of mitochondria associated with isolated egg cortex // Develop., Growth and Differ. 1985. Vol. 27, N 2. P. 149–154.
Shimizu T. Bipolar segregation of mitochondria, actin network, and surface in the Tubifex egg: Role of cortical polarity // Develop. Biol. 1986. Vol. 116. P. 241–251.
Shimizu T. Localization of actin networks during early development of Tubifex embryos // Ibid. 1988. Vol. 125. P. 321–331.
Shimizu T. Polar body formation in Tubifex eggs // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1990. Vol. 582. P. 260–272.
Shimizu T. Asymmetric segregation and polarized redistribution of pole plasm during early cleavage in the Tubifex embryo: Role of actin networks and mitotic apparatus // Develop., Growth and Differ. 1989. Vol. 31, N 3. P. 283–297.
Simkiss K. Cellular aspects of calcification // The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. Columbia: Univ. of Carolina press, 1976. P. 1–31.
Singer I.I., Kawka D.W., Kazazis D.M., Clark R.A.F. In vivo codistribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: Immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface // J. Cell Biol. 1984. Vol. 98, N 6. P. 2091–2106.
Singer S.J. Intercellular communication and cell-cell adhesion // Science. 1992. Vol. 255. P. 1671–1677.
Singer S.J., Kupfer A. The directed migration of eukaryotic cells // Annu. Rev. Cell Biol. 1986. Vol. 2. P. 337–365.
Slack J.M.W. Positional information in the forelimb of the axolotl: Properties of the posterior skin // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1983. Vol. 73. P. 233–247.
Slack J.M.M. We have a morphogen // Nature. 1987. Vol. 327, N 6123. P. 553–554.
Sluder G., Miller F.J., Lewis K., Davidson E.D., Rieder C.L. Centrosome inheritance in starfish zygotes: Selective loss of the maternal centrosome after fertilization // Develop. Biol. 1989. Vol. 131, N 2. P. 567–579.
Smiley S., Cloney R.A. Ovulation and the fine structure of the Stichopus californicus

(Echinodermata: Holothuroidea) fecund ovarian tubules // Biol. Bull. 1985. Vol. 169, N 2. P 342–364.
Sminia T., Borghart-Reinders E., Van de Linde A.W. Encapsulation of foreign materials experimentally introduced into the freshwater snail Lymnaea stagnalis // Cell and Tissue Res. 1974. Vol. 153. P. 307–326.
Sminia T., Van der Knaap W.P.W. Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs // Immunity in invertebrates. B. etc.: Springer, 1986. P. 112–124.
Sminia T., Van der Knaap W.P.W. The forgotten creatures: Immunity in invertebrates // Develop. Comp. Immunol. N.Y.; Liss, 1987. P. 157–162.
Smith A.C. Color change in sea cucumber coelomic fluid as a possible indicator of environmental stress // J. Aquaricult. Aquat. Sci. 1983. Vol. 3, N 3. P. 51–52.
Smith J.C. Evidence for a positional memory in the development of the chick wing bud // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1979. Vol. 52. P. 105–114.
Smith R.C. Protein synthesis and messenger RNA levels along the animal-vegetal axis during early Xenopus development // Ibid. 1986. Vol. 95. P. 15–35.
Smith V.J. The echinoderms // Invertebrate blood cells. N.Y. etc.: Acad. press, 1981. P. 513–562.
Sobel J.S. Myosin rings and spreading in mouse blastomeres // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99, N 3. P. 1145–1150.
Sobel J.S., Alliegro M.A. Changes in the distribution of a spectrin-like protein during development of preimplantation mouse embryo // Ibid. 1985. Vol. 100. P. 333–336.
Sobel J.S., Goldstein E.G., Venuti J.M., Welsh M.J. Spectrin and calmodulin in spreading mouse blastomeres // Develop. Biol. 1988. Vol. 126, N 1. P. 47–56.
Söderhall K., Smith V.J. The prophenoloxidase activating system: The biochemistry of its activation and role in arthropod cellular immunity with special reference to crustaceans // Immunity in invertebrates. B.; Heidelberg: Springer, 1986. P. 208–223.
Solursch M. Migration of sea urchin primary mesenchyme cells // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.; L.: Plenum press, 1986. Vol. 2. P. 391–431.
Speksnijder J.E., De Long K., Wisselaar H.A., Linnemans W.A.M., Dohmen M.R. The ultrastructural organization of the isolated cortex in eggs of Nassarius reticulatus (Mollusca) // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1989. Vol. 198. P. 119–128.
Speksnijder J.E., Dohmen M.R., Van Zoelen E.J.J. et al. Lateral mobility of plasma lipids in a molluscan egg: Evidence for an animal/vegetal polarity // Cell Biol. Intern. Rep. 1984. Vol. 8, N 4. P. 270.
Spiegel E., Howard L. Development of cell junctions in sea urchin embryos // J. Cell Sci. 1983. Vol. 62. P. 27–48.
Spiegel E., Howard L. The coincident time-space pattern of septate junction development in normal and exogastrulated sea urchin embryos // Exp. Cell Res. 1985. Vol. 161, N 1. P. 75–87.
Spiegel E., Spiegel M. Cell-cell interactions during sea urchin morphogenesis // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.; L.: Plenum press, 1986. Vol. 2. P. 195–240.
Spiegel E., Spiegel M. The hyaline layer is a collagen-containing extracellular matrix in sea urchin embryos and reaggregating cells // Exp. Cell Res. 1979. Vol. 123. P. 434–440.
Spiegel M., Spiegel E. The reaggregation of dissociated embryonic sea urchin cells // Amer. Zool. 1975. Vol. 15, N 3. P. 583–606.
Spudich A., Spudich J.A. Actin in triton-treated cortical preparations of unfertilized and fertilized sea urchin eggs // J. Cell Biol. 1979. Vol. 82, N 1. P. 212–220.
Spudich A., Wrenn J.T., Wessells N.K. Unfertilized sea urchin eggs contain a discrete cortical shell of actin that is subdivided into two organizational states // Cell Motil. and Cytoskel. 1988. Vol. 9, N 1. P. 85–96.
Spudich J.A., Amos L.A. Structure of actin filament bundles from microvilli of sea urchin eggs // J. Mol. Biol. 1979. Vol. 129. P. 319–331.
Stanisstreet M., Jumah H. Calcium, microfilaments and morphogenesis // Life Sci. 1983. Vol. 33, N 1. P. 1433–1441.

Stein P.C., Basch P.F. Purification and binding properties of hemagglutinin from Biomphalaria glabrata // J. Invertebr. Pathol. 1979. Vol. 33. P. 10–18.
Steinberg M.S. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? // J. Exp. Zool. 1970. Vol. 173, N 4. P. 395–434.
Stenman S., Wartivaara J., Vaheri A. Changes in the distribution of a major fibroblast protein, fibronectin, during mitosis and interphase // J. Cell Biol. 1977. Vol. 74. P. 453–467.
Stephens L., Kitajima T., Wilt F. Autonomous expression of tissue-specific genes in dissociated sea urchin embryos // Development. 1989. Vol. 107. P. 299–307.
Stephens R.E. Membrane protein reorganization during actin-mediated cell transformation in sea urchin coelomocytes // J. Cell Biol. 1978. Vol. 79, N 2. Pt 2. P. 272a.
Stern C.D. A simple model for early morphogenesis // J. Theor. Biol. 1984. Vol. 107, N 2. P. 229–242.
Stewart R. Relocalization of the dorsal protein from the cytoplasm to the nucleus correlates with its function // Cell. 1989. Vol. 59, N 6. P. 1179–1188.
St Johnston D., Driever W., Berleth T., Richstein S., Nüsslein-Volhard C. Multiple steps in the localization of bicoid RNA to the anterior pole of the Drosophila oocyte // Development. 1989. Suppl. P. 13–19.
St Johnston D., Nüsslein-Volhard C. The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo // Ibid. 1992. Vol. 68. P. 201–219.
Stockdale F.E., Miller J.B. The cellular basis of myosin heavy chain isoform expression during development of avain skeletal muscle // Develop. Biol. 1987. Vol. 1. P. 1–9.
Stopak D., Harris A.K. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. 1. Tissue culture observations // Ibid. 1982. Vol. 90, N 2. P. 383–398.
Strome S. Asymmetric movements of cytoplasmic components in Caenorhabditis elegans zygotes // J. Embryol and Exp. Morphol. 1986. Vol. 97, suppl. P. 15–29.
Struhl G., Struhl K., MacDonald P.M. The gradient morphogen bicoid is a concentration-dependent transcriptional activator // Cell. 1989. Vol. 57. P. 1259–1273.
Sucov H.M., Benson S., Robinson J.J., Britten R.J., Wilt F., Davidson E.H. A lineage-specific gene encoding a major matrix protein of the sea urchin embryo spicule // Develop. Biol. 1987. Vol. 120. P. 507–519.
Sugahara K., Caldwell J.H., Mason R.J. Electrical currents flow out of domes formed by cultured epithelial cells // J. Cell Biol. 1984. Vol. 99. P. 1541–1546.
Suzuki N., Mihashi K. High-affinity binding of cytochalasin B to B-end of F-actin loses its inhibitory effect on subunit exchange when the bound nucleotide is ADP // J. Biochem. 1991. Vol. 110. P. 514–519.
Suzuki T., Funakoshi S. Isolation of a fibronectin-like molecule from a marine bivalve, Pinctada fucata, and its secretion by amebocytes // Zool. Sci. 1992. Vol. 9, N 3. P. 541–550.
Suzuki T., Yoshinaka R., Mizuta S., Funakoshi S., Wada K. Extracellular matrix formation by amebocytes during epithelial regeneration in the pearl oyster Pinctada fucata // Cell and Tissue Res. 1991. Vol. 266. P. 75–62.
Swalla B.J., Moon R.T., Jeffery W.R. Developmental significance of a cortical cytoskeletal domain in Chaetopterus eggs // Develop. Biol. 1985. Vol. 111, N 2. P. 434–450.
Tanaka Y. Effects of the surfactants on the cleavage and further development of sea urchin embryos. 1. Inhibition of micromere formation at fourth cleavage // Develop., Growth and Differ. 1976. Vol. 18, N 2. P. 113–122.
Tanaka Y. Distribution and redistribution of pigment granules in the development of sea urchin embryos // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1981. Vol. 190, N 2. P. 267–273.
Tassin A.M., Maro B., Bornens M. Fate of microtubule organizing centres during in vitro myogenesis // J. Cell Biol. 1985. Vol. 100. P. 35–46.
Technau G.M. A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embryogenesis of Drosophila melanogaster // Development. 1987. Vol. 100. P. 1–12.
Terasaki M., Jaffe L.A. Organization of the sea urchin egg endoplasmic reticulum and its reorganization at fertilization // J. Cell Biol. 1991. Vol. 114, N 5. P. 929–940.

Terasaki M., Sardet C. Demonstration of calcium uptake and release by sea urchin egg cortical endoplasmic reticulum // Ibid. 1991. Vol. 115, N 4. P. 1031–1037.
Tetteroo P.A.T., Bluemink J.G., Dictus W.J.G. et al. Lateral mobility of plasma membrane lipids in dividing Xenopus eggs // Develop. Biol. 1984. Vol. 104, N 1. P. 210–218.
Thibault C., Szöllösi D., Gerard M. Mammalian oocyte maturation // Reprod. Nutr. Develop. 1987. Vol. 27, N 5. P. 865–896.
Tilney L.G., Gibbins J.R. Microtubules in the formation and development of the primary mesenchyme in Arbacia punctulata. 2. An experimental analysis of their role in development and maintenance of cell shape // J. Cell Biol. 1969. Vol. 41, N 1. P. 227–250.
Tilney L.G., Jaffe L.A. Actin, microvilli and the fertilization cone of sea urchin eggs // Ibid. 1980. Vol. 87, N 3, pt 1. P. 771–782.
Tilney L.G., Tilney M.S. Observations on how actin filaments become organized in cells // Ibid. 1984. Vol. 99, N 1. P. 76s–82s.
Timourian H., Watchmaker G. The sea urchin blastula: Extent of cellular determination // Amer. Zool. 1975. Vol. 15, N 3. P. 607–627.
Tricoire H. Dominant maternal interactions with Drosophila segmentation genes // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1988. Vol. 197, N 2. P. 115–123.
Trinkaus J.P. Cells into organs: The forces that shape the embryo. Englewood Cliffs: Prentice-Hall, 1969. 2nd ed., 1984. 543 p.
Trotter J.A., Nameroff M. Myoblast differentiation in vitro: morphological differentiation of mononucleated myoblast // Develop. Biol. 1976. Vol. 49. P. 548–555.
Tucker B.E., Hoch H.C., Staples R.C. The involvement of F-actin in Uromyces cell differentiation: The effect of cytochalasin E and phalloidin // Protoplasma. 1986. Vol. 135, N 1. P. 88–101.
Tucker J.B. Cytoskeletal coordination and intercellular signalling during metazoan embryogenesis // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1984a. Vol. 65. P. 1–25.
Tucker J.B. Spatial organization of microtubule-organizing centers and microtubules // J. Cell Biol. 1984b. Vol. 99, N 1, pt 2. P. 55s–62s.
Turian G. Another model of cell polarity: The outgrowing fungal spore // Arch. Sci. 1985. Vol. 38, N 3. P. 419–426.
Turian G., Ojha M. Disruption of the bipolar gametangial segregation by anticytoskeletal chemicals in Allomyces // Bot. helvet. 1987. Vol. 97, N 2. P. 357–360.
Turner C., Newton M.R., Shotton D.M. Cytoskeletal involvement in the sequential capping of rat thymocytes surface glycoproteins // J. Cell Sci.. 1988. Vol. 89. P. 309–319.
Turner D.C. Cell-cell and cell-matrix interactions in the morphogenesis of skeletal muscle // Developmental biology: A comprehensive synthesis. N.Y.: Plenum press, 1986. Vol. 3. P. 205–224.
Turner D.C., Carbonetto S.T. Model systems for studying the functions of extracellular matrix molecules in muscle development // Exp. Biol. Med. 1984. Vol. 7. P. 72–79.
Turner D.C., Gibralter D. Regulation of cell interactions during skeletal muscle development // Curr. Top. Cell. Regulat. 1985. Vol. 26. P. 115–126.
Turner D.C., Gmür R., Lebherz H.G. et al. Differentiation in cultures derived from embryonic chicken muscle // Develop. Biol. 1976. Vol. 48. P. 284–307.
Turner D.C., Lawton J., Dollenmeier P., Ehrismann R., Chiquet M. Guidance of myogenic cell migration by oriented deposits of fibronectin // Ibid. 1983. Vol. 95. P. 497–504.
Turner R.S. Evidence for two types of cell adhesion in cleavage stage sea urchin embryo // J. Cell Biol. 1980. Vol. 87, N 2, pt 2. P. 133a.
Ubbels G.A., Hara K., Koster C.H., Kirschner M.W. Evidence for a functional role of the cytoskeleton in determination of the dorsoventral axis in Xenopus laevis eggs // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1983. Vol. 77. P. 15–37.
Urben S., Nislow C., Spiegel M. The origin of skeleton forming cells in the sea urchin embryo // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1988. Vol. 197. P. 447–456.
Usui N., Yoneda M. Regional response to cytochalasin B of the equatorial cell cortex in sea-urchin eggs during the first mitosis // Develop., Growth and Differ. 1989. Vol. 31, N 3. P. 257–267.
Uzman J.A., Jeffery W.R. Cytoplasmic determinants for cell lineage specification in ascidian embryos // Cell Differ. 1986. Vol. 18, N 4. P. 215–224.
Vacquier V.D. Dynamic changes of the egg cortex // Develop. Biol. 1981. Vol. 84, N 1. P. 1–26.
Vacquier V.D., Mazia D. Twinning of sand dollar embryos by means of dithiothreitol: The structural basis of blastomere interactions // Exp. Cell Res. 1968a. Vol. 52. P. 209–221.
Vacquier V.D., Mazia D. Twinning of sea urchin embryos by treatment with dithiothreitol: Roles of cell surface interactions and of the hyaline layer // Ibid. 1968b. Vol. 52. P. 459–468.
Van den Bossche J.P., Jangoux M. Epithelial origin of starfish coelomocytes // Nature. 1976. Vol. 261. P. 227–228.
Vandenburgh H.H. Dynamic mechanical orientation of skeletal myofibers in vitro // Develop. Biol. 1982. Vol. 93. P. 438–443.
Vandenburgh H.H. Cell shape and growth regulation in skeletal muscle: Exogenous versus endogenous factors // J. Cell Physiol. 1983. Vol. 116. P. 363–371.
Vandenburgh H.H., Hatfaludy S., Karlish P., Shansky J. Mechanically induced alterations in cultured skeletal muscle growth // J. Biomech. 1991. Vol. 24, suppl. 1. P. 91–100.
Vasiliev J.M. Spreading and locomotion of tissue cells: Factors controlling the distribution of pseudopodia // Philos. Trans. Roy. Soc. London B. 1982. Vol. 299, N 1094. P. 159–168.
Vasiliev J.M. Actin cortex and microtubular system in morphogenesis: Cooperation and competition // J. Cell Sci. 1987. Suppl. 8. P. 1–18.
Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Mechanisms of morphogenesis in cell cultures // Intern. Rev. Cytol. 1977. Vol. 50. P. 159–274.
Vasiliev J.M., Gelfand I.M. Possible common mechanism of morphological and growth-related alterations accompanying neoplastic transformations // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1982. Vol. 79, N 8. P. 2594–2597.
Venuti J.M., Edds T. Calmodulin and calmodulin-binding proteins in the morphological tranformations of sea urchin coelomocytes // Cell Motil. Cytoskel. 1986. Vol. 6. P. 604–619.
Venuti J.M., Jeffery W.R. Cell lineage and determination of cell fate in ascidian embryos // Intern. J. Develop. Biol. 1989. Vol. 33. P. 197–212.
Waaland S.D. Positional control of development in algae // Positional control in plant development. Cambridge etc.: Cambridge Univ. press, 1984. P. 138–156.
Wagner D.D., Hynes R.O. Fibronectin-coated beads are endocytosed by cells and align with microfilament bundles // Exp. Cell Res. 1982. Vol. 140. P. 373–381.
Walker I. Biological memory // Acta biotheor. 1972. Vol. 21, fasc. 3/4. P. 203–235.
Warren R.H. Microtubule organization in elongating myogenic cell // J. Cell Biol. 1974. Vol. 63, N 2, pt 1. P .550–566.
Warren R.H. Myoblasts are aligned with collagen fibrils in regenerating frog tadpole tails // Tissue and Cell. 1981. Vol. 13, N 4. P. 773–785.
Wassarman P.M., Ukena T.E., Josefowicz W.J., Karnovsky M.J. Asymmetrical distribution of microvilli in cytochalasin B-induced pseudocleavage of mouse oocytes // Nature. 1977. Vol. 265, N 5595. P. 742–744.
Weber K., Bibring T., Osborn M. Specific visualization of tubulin-containing structures in tissue culture cell by immunofluorescence // Exp. Cell Res. 1975. Vol. 95. P. 111–120.
Weiss P. von. The problem of specificity in growth and development // Yale J. Biol. Med. 1947. Vol 19, N 3. P. 235–278.
Weiss P. von. "Attraction fields" between growing tissue cultures // Science. 1952. Vol. 115. P. 293–295.
Weiss P. von. Guiding principles in cell locomotion and cell aggregation // Exp. Cell Res. 1961. Suppl. 8. P. 260–281.

Weiss P. von. Dynamic of development: Experiments and inferences. N.Y.; L.: Acad. press, 1968. 624 p.
Weiss P., Garber B. Shape and movement of mesenchyme cells as functions of the physical structure of the medium: Contributions to a quantitative biology // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1952. Vol. 38. P. 264–280.
Weiss P., Taylor C. Fish scales as substratum for uniform orientation of cells in vitro // Anat. Rec. 1956. Vol. 124. P. 381.
Wessel G.M., Marchase R.B., McClay D.R. Ontogeny of the basal lamina in the sea urchin embryo // Develop. Biol. 1984. Vol. 103, N 1. P. 235–245.
Wilbur K.M. Recent studies of invertebrate mineralization // The mechanisms of mineralization in invertebrates and plants. Columbia: Univ. of Carolina press, 1976. P. 79–108.
Wilbur K.M. Many minerals, several phyla, and a few considerations // Amer. Zool. 1984. Vol. 24, N 4. P. 839–845.
Wilde C.E. Differentiation in response to the biochemical environment // Cell, organism and milieu. N.Y., 1959. P. 3–44.
Willmer E.N. Factors which influence the acquisition of flagella by the amoeba Naegleria gruberi // J. Exp. Biol. 1956. Vol. 33. P. 583–603.
Willmer E.N. Further observations on the metaplasia of an amoeba // J. Embryol. and Exp. Morph. 1958. Vol. 6. P. 187–214.
Wilson E.B. The cell in development and heredity. N.Y.: MacMillan, 1925. 1962 p.
Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation // J. Theor. Biol. 1969. Vol. 25, N 1. P. 1–47.
Wolpert L. Positional information and pattern formation // Philos. Trans. Roy. Soc. London B. 1981. Vol. 295, N 1078. P. 441–450.
Wolpert L. Positional information and pattern formation // Molecular determinants of animal form. N.Y.: Liss, 1985. P. 423–433.
Wolpert L. Positional information revisited // Development. 1989. Suppl. P. 3–12.
Wolpert L., Gustafson T. Studies on the cellular basis of morphogenesis of the sea urchin embryo: Development of the skeletal pattern // Exp. Cell Res. 1961. Vol. 25, N 2. P. 311–325.
Wolpert L., Mercer E.H. An electron microscope study of the development of the blastula of the urchin embryo and its radial polarity // Ibid. 1963. Vol. 30, N 2. P. 280–300.
Wray G.A., McClay D.R. The origin of spicule-forming cells in a "primitive" sea urchin (Eucidaris tribuloides) which appears to lack primary mesenchyme cells // Development. 1988. Vol. 103. P. 305–315.
Wray G.A., Raff R.A. Evolutionary modification of cell lineage in the direct-developing sea urchin Heliocidaris erythrogramma // Develop. Biol. 1989. Vol. 132. P. 458–470.
Wylie C.C., Brown D., Godsave S.F. et al. The cytoskeleton of Xenopus oocytes and its role in development // J. Embryol. and Exp. Morphol. 1985. Vol. 89, suppl. P. 1–15.
Yaffe D. Cellular aspects of muscle differentiation in vitro // Curr. Top. Develop. Biol. 1969. Vol. 4. P. 37–77.
Yaffe D., Feldman M. The formation of hybrid multinucleated muscle fibers from myoblasts of different genetic origin // Develop. Biol. 1965. Vol. 11. P. 300–317.
Yamada K.M., Yamada S.S., Pastan I. Cell surface protein partially restores morphology, adhesiveness and contact inhibition of movement to transformed fibroblasts // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1976. Vol. 73. P. 1217–1221.
Yazaki I. The egg originated and local distribution of the surface of sea-urchin embryo cells detected by immunofluorescence // Acta embryol. et morphol. exp. 1984. Vol. 5, N 1. P. 3–22.
Yazaki I. Polarization of the surface membrane and cortical layer of sea urchin blastomeres and its inhibition by cytochalasin B. // Develop., Growth and Differ. 1991. Vol. 33, N 3. P. 267–276.
Yazaki I., Uemura I. Immunocytochemical evidence for the presence of two domains in the plasma membrane of sea urchin blastomeres // W. Roux's Arch. Develop. Biol. 1989. Vol. 198. P. 179–184.

Yonemura S., Kinoshita S. Actin filaments organization in the sand dollar egg cortex // Develop. Biol. 1986. Vol. 115, N 1. P. 171–183.
Yonemura S., Mabuchi I. Wave of cortical actin polymerization in the sea urchin egg // Cell Motil. Cytoskel. 1987. Vol. 7, N 1. P. 46–53.
Yonemura S., Mabuchi I., Tsukita S. Mass isolation of cleavage furrows from dividing sea urchin eggs // J. Cell Sci. 1991. Vol. 100. P. 73–84.
Yoshizato K., Obinata T., Huang H., Matsuda R., Shioya N., Miyata T. In vitro orientation of fibroblasts and myoblasts on aligned collagen film // Develop., Growth and Differ. 1981. Vol. 23, N 2. P. 175–184.
Yürüker B., Niggli V. Alpha-actinin and vinculin in human neutrophils: Adhesion and relation to the actin network // J. Cell Sci. 1992. Vol. 101. P. 403–414.
Zalokar M. Activation of ascidian eggs with lectins // Develop. Biol. 1980. Vol. 79, N 1. P. 232–237.
Zucco T., Persiko M., Felsani A., Metafora S., Augusti-Tocco G. Regulation of protein synthesis at the translational level in neuroblastoma cells // Proc. Nat. Acad. Sci. US. 1975. Vol. 72. P. 2289–2293.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Научное издание

Исаева Валерия Васильевна

КЛЕТКИ В МОРФОГЕНЕЗЕ

Утверждено к печати
Институтом биологии моря
Дальневосточного отделения
Российской академии наук

Редактор издательства *И.С. Левитина*
Художник *Е.Б. Иваненко*. Художественный редактор *Н.Н. Михайлова*
Технический редактор *Т.А. Резникова*. Корректор *Л.А. Агеева*
Набор выполнен в издательстве на наборно-печатающих автоматах

ИБ № 979

ЛР 020297 от 27.11.91. (срок действия 5 лет)

Подписано к печати 24.12.93. Формат 60 × 90 1/16 Гарнитура Пресс—Роман
Печать офсетная Усл.печ.л. 14,0 Усл.кр.-отт. 14,3
Уч.-изд.л. 16,8 Тираж 250 экз. Тип.зак. 19